

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO**

REGINA GONÇALVES DOS SANTOS OLIVEIRA

**MURCHA-DE-CERATOCYSTIS EM EUCALIPTO: MÉTODO DE
DETECÇÃO NÃO DESTRUTIVO E PRECOCE DA RESISTÊNCIA E
ASPECTOS MORFOFISIOLÓGICOS E ANATÔMICO DA INFECÇÃO**

**ALEGRE - ES
2017**

REGINA GONÇALVES DOS SANTOS OLIVEIRA

**MURCHA-DE-CERATOCYSTIS EM EUCALIPTO: MÉTODO DE
DETECÇÃO NÃO DESTRUTIVO E PRECOCE DA RESISTÊNCIA E
ASPECTOS MORFOFISIOLÓGICOS E ANATÔMICO DA INFECÇÃO**

Tese apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientadora: Profa Dra Marcia Flores da Silva Ferreira. Co-orientador: Prof. Dr. Willian Bucker Moraes.

**ALEGRE - ES
2017**

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)

(Biblioteca Setorial de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

Oliveira, Regina Gonçalves dos Santos, 1956-

O48m Murcha-de-Ceratocystis em eucalipto: método de detecção não destrutivo e precoce da resistência e aspectos morfofisiológicos e anatômico da infecção / Regina Gonçalves dos Santos Oliveira. – 2017.

75 f. : il.

Orientador: Marcia Flores da Silva Ferreira.

Coorientadores: Willian Bucker Moraes.

Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias.

1. Eucalipto. 2. Xilema. 3. Resistência a doenças e pragas. 4. Fungos fitopatogênicos. 5. Doenças fungicas. I. Ferreira, Marcia Flores da Silva. II. Moraes, Willian Bucker. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. IV. Título.

CDU: 575:631

Dedico

À minha neta querida Melinda e filha Melissa.

À minha mãe e ao meu irmão que sempre acreditaram em mim.

À Dona Zilda, minha sogra, que me acolheu como filha.

Ao meu esposo Paulo Cesar Oliveira, *in memoriam*.

À minha família

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida.

À minha Orientadora Profa Dra Marcia Flores da Silva Ferreira, pela amizade, confiança, pelos ensinamentos, conselhos, pela orientação, sugestões, além do apoio durante a realização do trabalho.

Ao meu Co-orientador Prof. Dr. Willian Bucker Moraes, pela amizade, apoio, por muito ter me ensinado, pela co-orientação, pelas sugestões.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento e a Universidade Federal do Espírito Santo.

À Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação pelo apoio financeiro através do PROAP.

À Dra Liana Hilda Golin Mengarda, pelo apoio, pelas orientações e sugestões.

Ao Dr Leonidas Leoni Belan pela ajuda na minha pesquisa, apoio e sugestões.

À Profa Dra Maria Alves Ferreira por ter cedido o inóculo, DFP/ UFLA.

Aos Professores Adésio Ferreira, José Carlos Lopes, Marcelo Tomaz, Fábio Demolinari, Adriana Madeira, Dirceu Pratissoli, Edivaldo Fialho dos Reis, José Tarciso pela colaboração com a pesquisa.

Aos queridos amigos, Ramon, Iana, Carolina, Patrícia, Leonardo Mardgan, Carlos Magno, Marcelo, Leonardo Belan, Ângelo, Atháise, Mariana, Brumella, José Geraldo, Silvani, John Lenon, Guilherme, Rodolfo, Tatiana, Natan, Sabrina e Débora, este trabalho não teria realizado sem a colaboração de todos.

Aos alunos e amigos do Laboratório de Genética e Melhoramento, Biometria e do Setor de Fitopatologia/ NUDEMAFI/CCAUE/UFES.

OLIVEIRA, Regina Gonçalves dos Santos, Universidade Federal do Espírito Santo. Fevereiro de 2017. **MURCHA-DE-CERATOCYSTIS EM EUCALIPTO: MÉTODO DE DETECÇÃO NÃO DESTRUTIVO E PRECOCE DA RESISTÊNCIA E ASPECTOS MORFOFISIOLÓGICOS E ANATÔMICO DA INFECÇÃO.**

Orientadora: Profa. Dra Marcia Flores da Silva Ferreira.

Co-orientador: Prof. Dr. Willian Bucker Moraes.

RESUMO

Ceratocystis fimbriata Ellis & Halsted é um patógeno que causa murcha vascular em *Eucalyptus*, considerado de difícil controle devido ao seu caráter sistêmico e variabilidade genética dos isolados. O plantio de material resistente é a principal forma de controle. Sendo assim, no presente trabalho objetivou-se: 1) desenvolver um método de detecção fenotípica precoce e não destrutiva com discos foliares de clones (*E. grandis* x *E. urophylla*), quanto à resistência em eucalipto a infecção de *C. fimbriata*. 2) avaliar respostas morfofisiológicas e anatômicas a infecção de *C. fimbriata* em clones de eucalipto. Foram utilizados os clones AEC 1528, BA 7346, CO 1407 e BA 6021 (seis meses de idade). Primeiramente, foram inoculados 0,1 mL de esporos do fungo ($2,5 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$), com seringa, no tecido foliar próximo a nervura, na face adaxial dos discos foliares (Ø2 cm) de cada clone e mantidos em câmara úmida e climatizada. A severidade foi avaliada após seis dias de inoculação. Para a comparação dessa metodologia, discos de meio de cultura MAEY (Ø5mm) com micélio do fungo, foram colocados em ferimentos (dois cm de comprimento) entre o lenho e a casca, no caule de 10 plantas por clone e mudas como controle (sem fungo). Para ambos os ensaios foi utilizado escala de frequência, sendo possível distinguir clones resistentes de suscetíveis. Ao término do segundo experimento foram feitas análises morfológicas, matéria seca das folhas e do caule, altura e diâmetro do caule dos clones infectados e não infectados e análises anatômicas no local da lesão e três cm antes e depois da lesão, para avaliação do crescimento do micélio de *C. fimbriata* nos vasos do xilema, antes e após 50 dias, da inoculação. Pode-se observar mecanismo de resistência: gomas ou géis, tecidos novos próximos à região de infecção.

Palavras-chave: murcha, *Ceratocystis fimbriata*, *Eucalyptus*, xilema, resistência

OLIVEIRA, Regina Gonçalves dos Santos, Universidade Federal do Espírito Santo. Fevereiro de 2017. **CERATOCYSTIS WILT IN EUCALIPTUS: NON-DESTRUCTIVE AND EARLY DETECTION METHOD AND MORPHOPHYSIOLOGICAL-ANATOMICAL ASPECTS OF INFECTION**. Advisor: Profa. Dra Marcia Flores da Silva Ferreira; Co-advisor: Prof. Dr. Willian Bucker Moraes.

ABSTRACT

Pathogen's Ceratocystis fimbriata Ellis & Halsted causes wilt in *Eucalyptus*, it's difficult to control systemic character and genetic variability of the isolates. The resistant material is the main control form. Thus, in the present work aimed to: 1) to study early and non-destructive phenotypic evaluation methodology in leaf discs of clones (*E. grandis* x *E. urophylla*), to eucalyptus resistance of the *C. fimbriata* infection. 2) to evaluate morphophysiological and anatomical responses to *C. fimbriata* infection in eucalyptus clones. Clones of AEC 1528, BA 7346, CO 1407, BA 6021 (six- months-old years) were used. First, 0.1 mL of fungus spores ($2.5 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$) were inoculated in genotypes's leaf disc (Ø2 cm), in the adaxial leaf surface, near midrib and kept in chamber humidity in an air-conditioned room. After, 6 days of inoculation the severity was evaluated. In order to compare this methodology, disks (Ø5mm) of MAEY with fungus's mycelium. A cut lengthwise 2 cm length was made on the stem in 10 plants and seedlings control (without fungus). For both tests, frequency scale was used and different resistance levels were found, since high resistance until high susceptibility. In the second experiment, morphological analyzes, leaf and stem dry matter, height and stem diameter of the infected and uninfected clones were performed, and anatomical analyzes were performed at the lesion site and 3 cm before and after the lesion, of the mycelium of *C. fimbriata* growth avaliation in the xylem vessels, before and after 50 days, of the inoculation. It observed mechanism of resistance: gels, new tissues near the infection region.

Keywords: wilt, *Ceratocystis fimbriata*, *Eucaliptus*, xylem, resistance.

Lista de figuras

Capítulo 1

- Figura 1. Montagem do experimento de avaliação da infecção por *Ceratocystis fimbriata* em discos foliares de híbridos de eucalipto... 31
- Figura 2. Sintomas observados no tecido de disco foliar de clones de eucalipto, cinco dias após a inoculação de *Ceratocystis fimbriata*..... 34
- Figura 3. Número médio de peritécios em discos foliares de clones de eucalipto, cinco dias após a inoculação com *Ceratocystis fimbriata* 35
- Figura 4. Severidade da infecção em discos foliares de clones de eucalipto infectados com *Ceratocystis fimbriata* durante cinco dias após a inoculação (DAI)..... 36
- Figura 5. Discos foliares inoculados com *Ceratocystis fimbriata* cinco dias após a inoculação (DAI)..... 37
- Figura 6. Área abaixo da curva de progresso da doença total (AACPD) calculada para diferentes clones de eucaliptos inoculados com *Ceratocystis fimbriata*..... 38
- Figura 7. Escurecimento do vaso do xilema de clones de eucalipto, 50 dias após inoculação com *Ceratocystis fimbriata*..... 39
- Figura 8. Sintoma de infecção por *Ceratocystis fimbriata* no clone BA 6021..... 40
- Figura 9. (a) Comprimento médio do escurecimento do xilema, causado pela infecção de *Ceratocystis fimbriata* nos clones de eucalipto. (b) Distribuição das frequências de classes de resistência apresentada pelos clones de eucalipto 50 dias após a inoculação..... 41
- Figura 10. Avaliação da severidade da infecção de clones de Eucalipto por *C. fimbriata*.... 43

Capítulo 2

- Figura 1. Crescimento médio acumulado do caule em altura (cm) e diâmetro (mm) para quatro clones de eucalipto em plantas não inoculadas (azul) e inoculadas (laranja) aos 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42 e 50 dias após a inoculação..... 59
- Figura 2. Secções transversais de caule de clone de eucalipto: 2a – 2d..... 62
- Figura 3. Secções transversais de caule de clone de eucalipto: 3a – 3d..... 63
- Figura 4. Secções transversais de caule de clone de eucalipto: 4a – 4d..... 64
- Figura 5. Secções transversais de caule de clone de eucalipto: 5a – 5d..... 65
- Figura 6. Porcentagem de vasos do xilema infectados de quatro clones de eucalipto, 50 dias após a inoculação com *Ceratocystis fimbriata*..... 66

Lista de tabelas

Capítulo 1.

Tabela 1. Médias da severidade (%), comprimento da infecção no xilema (cm) e altura da planta (cm).....	40
---	----

Capítulo 2.

Tabela 1. Características morfológicas de clones de <i>Eucalyptus</i> inoculados e não inoculados com <i>Ceratocystis fimbriata</i> , 50 dias após a inoculação. Matéria seca da folha (MSF), matéria seca do caule (MSC), altura da planta e diâmetro do caule.....	58
--	----

Tabela 2. Médias das variáveis fisiológicas em clones de eucalipto infectados (I) e não infectados (NI) por <i>Ceratocystis fimbriata</i> : fotossíntese líquida ((A) $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), condutância estomática (g_s , $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), taxa de transpiração ((E) $\mu\text{mmol de H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e concentração intercelular de CO_2 e concentração ambiente de CO_2 (C_i/C_a) ($\mu\text{mmol de H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) aos 50 dias após infecção.....	60
--	----

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	10
OBJETIVOS	12
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
Importância da doença	14
Disseminação de <i>Ceratocystis fimbriata</i>	15
Resistência à <i>Ceratocystis</i>	16
Estratégia de resistência da planta a <i>Ceratocystis fimbriata</i>	17
Quantificação de doenças	18
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
CAPÍTULO 1:.....	26
Resistência à <i>Ceratocystis fimbriata</i> : detecção precoce e não destrutiva em <i>Eucalyptus</i>	26
RESUMO	27
ABSTRACT	28
INTRODUÇÃO	29
MATERIAL E MÉTODOS	31
RESULTADOS	34
DISCUSSÃO	45
CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
CAPÍTULO 2.	52
Estudo morfofisiológico e anatômico da infecção de <i>Ceratocystis fimbriata</i> em <i>Eucalyptus</i> .	52
INTRODUÇÃO	55
MATERIAL E MÉTODOS	56
RESULTADOS	58
DISCUSSÃO	67
CONCLUSÃO	72
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	73
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	75

INTRODUÇÃO GERAL

O *Eucalyptus* foi introduzido no Brasil em 1903, ficando concentrado no Estado de São Paulo. Atualmente, o plantio de eucalipto atinge 5,63 milhões de hectares (IBA, 2016). No estado do Espírito Santo 278. 444 ha são cultivados com eucalipto (SNIF, 2016). O elevado número de espécies e clones confere à cultura variabilidade genética possibilitando adaptação a diversas condições edafoclimáticas, atendendo a inúmeros tipos de explorações econômicas. O gênero *Ceratocystis* é reconhecido como um complexo de espécies capaz de causar sintoma de murcha em plantas lenhosas, principalmente *Eucalyptus* spp. (ROSADO et al., 2016; FERNANDES et al., 2014; TUMURA et al., 2012; HARRINGTON et al., 2011).

O fungo fitopatogênico *Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halsted tem ampla distribuição geográfica e uma gama de hospedeiros (HARRINGTON et al., 2011). É uma doença sistêmica, que ocorre nos tecidos vasculares, principalmente o xilema, ocasionando descoloração do lenho (OLIVEIRA et al., 2015; FERREIRA et al., 2006). As plantas infectadas murcham, as folhas tendem a permanecerem presas aos ramos, ocorrem brotações ao longo do fuste, morte de ponteiros e da planta (ROSADO et al., 2016). Cortes perpendiculares ao eixo principal de árvores infectadas possibilitam visualizar descoloração radial, um dos sintomas típico da doença (ALFENAS et al., 2009).

O plantio de clones resistentes é a forma mais eficiente de controle de *C. fimbriata* em eucalipto (ROSADO et al., 2016; FERNANDES et al., 2014; ZAUZA et al., 2004). A herança genética da resistência é pouco conhecida, entretanto, a identificação de clones de *Eucalyptus* spp. resistentes tem sido o objetivo de vários estudos de avaliação de parentais e progênies de eucalipto (ROSADO et al., 2016 e 2010), visando fontes de resistência ao patógeno para uso no melhoramento genético. Nesse contexto, Zauza et al. (2004) avaliaram 10 híbridos de *E. grandis* × *E. urophylla*, quanto à infecção a dois isolados do fungo e identificaram quatro clones resistentes. Firmino et al. (2013) avaliaram clones de diferentes espécies (*E. grandis*, *E. urophylla*, *E. salicina*, *E. grandis* × *E. urophylla*, *E. grandis* × *E. dunni* e *E. grandis* × *E. smithii*) quanto à resistência a 20 isolados do fungo, das quais cinco foram resistentes. Tumura et al. (2012) estudaram 37 clones de duas procedências distintas, visando encontrar material resistente e encontraram materiais desde altamente resistente até a altamente suscetível.

A metodologia tradicionalmente utilizada nos estudos visando avaliar e selecionar clones de eucalipto quanto à resistência ao *C. fimbriata*, é a inoculação do fungo no tecido condutor da planta no caule, avaliando-se o comprimento da infecção no xilema entre 30 e 120 dias após a infecção (MAGALHÃES et al., 2015; FIRMINO et al., 2013; TUMURA et

al., 2012; MAFIA et al., 2011; ROSADO, 2009; ZAUZA et al., 2004; BAKER et al, 2003). Com tudo, essa metodologia requer a destruição das plantas avaliadas, longo tempo após a infecção para avaliar a reação dos clones, infraestrutura, condições controladas e mão de obra especializada. Além disto, podem ocorrer variações nos resultados do comprimento da infecção no xilema nas repetições de um mesmo clone, pois a extensão da penetração do fungo pode ocorrer de forma irregular (MAFIA et al., 2011).

As plantas se defendem do ataque de patógenos através de mecanismos de resistência, os quais podem ser de natureza estrutural e/ou bioquímica e podem ser formados antes (pré-formada/ constitutiva) ou após a infecção (pós-formada/induzida). Os fatores estruturais agem como uma barreira física, impedindo a penetração do patógeno e a colonização dos tecidos da planta, enquanto os fatores bioquímicos são substâncias produzidas pelo hospedeiro, que se mostram tóxicas ou criam condições adversas para o crescimento do patógeno no interior da planta (PASCHOLATI e LEITE, 1995). Através de estudos com cortes histológicos podem ser observados o desenvolvimento do micélio, gomas ou géis e deformação dos vasos do xilema causada por *C. fimbriata*.

Alguns estudos mostraram que a infecção por fungo interfere no processo fisiológico (TATAGIBA et al., 2015; FALAVESSA, 2014). Pshibytko et al., 2006 trabalharam com doença vascular em tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) infectado com *Fusarium oxysporum*, e observaram que a infecção do patógeno era rápida e ocorria obstrução no xilema e no floema. A circulação da seiva foi interrompida e as folhas da planta murcharam, e, conseqüentemente a atividade fotossintética ficou comprometida. Estudos em doenças foliares com processos fisiológicos demonstram que reduções dos parâmetros de trocas gasosas, como fotossíntese líquida (*A*), condutância estomática (*g_s*) e transpiração (*E*), confirmam o efeito prejudicial da infecção fúngica na fotossíntese foliar (DALLAGNOL et al., 2011).

O método rotineiramente utilizado pelas empresas eucaliptocultoras envolvendo corte no caule da planta para avaliação da infecção do xilema é destrutivo (MAGALHÃES et al., 2016, FIRMINO et al., 2015; MAFIA et al., 2011). Sendo assim, há necessidade de novos métodos sem os riscos de destruição de germoplasma importante. Portanto, a detecção fenotípica não destrutiva e precoce com discos foliares em conjunto com estudos morfofisiológicos e anatômicos em plantas, vem contribuir com o estudo da identificação de clones de eucalipto resistente ao *C. fimbriata* em programas de melhoramento genético.

OBJETIVOS

1. Geral

Deteção de *Ceratocystis* precoce e não destrutiva em discos foliares em clones comerciais, AEC 1528, BA 7346, BA 6021 e CO 1407 de híbridos interespecíficos de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophilla* da resistência ao *Ceratocystis fimbriata* e avaliação de alterações morfofisiológicas nestes clones decorrentes da infecção por este patógeno.

2. Específico

- a. Verificar a resistência dos clones comerciais: AEC 1528, BA 7346, BA 6021 e CO 1407 quanto ao *C. fimbriata*, por meio de metodologia de severidade da infecção no xilema comparada à metodologia de discos foliares e avaliar alterações morfofisiológicas nestes clones decorrente destes patógenos.
- b. Avaliar respostas fisiológicas, morfológicas e anatômicas à infecção de *C. fimbriata* em clones de eucalipto.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Importância do eucalipto

O gênero *Eucalyptus*, pertencente à família *Myrtaceae*, tem sua origem na Austrália, Indonésia exceto pelas espécies *E. urophylla* e *E. deglupta* nativas das ilhas na Oceania. Composto de oito subgêneros *Blakella*, *Eudesmia*, *Gaubacea*, *Idiogenes*, *Telocalyptus*, *Monicalyptus*, *Symphyomyrtus* e *Corymbia*. Com mais de 600 a 700 espécies já identificadas, com diferentes exigências quanto à fertilidade do solo, tolerância a geadas e a seca, possibilitando seu plantio em mais de 100 países, todos com importância econômica (FONSECA, 2010).

No Brasil, as principais espécies plantadas são *E. grandis*, *E. urophylla*, híbridos de *E. grandis* x *E. urophylla*, *E. citriodora*, *E. saligna*, *E. viminalis*, *E. camadulensis*, e outros. Destacam-se pela grande importância em plantas que visam a produção de papel, celulose, madeira e carvão, por apresentarem crescimento rápido e ser muito adaptadas as condições edafoclimáticas do país (FERREIRA et al, 2006). Além das funções produtoras, as plantas contribuem para a redução de gases causadores do efeito estufa, como fonte de energia renovável e atuam na conservação de recursos naturais, tais como solo e água (IBÁ, 2016).

De acordo com a Indústria Brasileira de Árvores (IBÁ), as plantas de eucalipto no Brasil ocupa uma área de aproximadamente 5,63 milhões de hectares, o que representa 71,9% do total de áreas de árvores plantadas no país, sendo os plantios localizados principalmente em Minas Gerais (24%), São Paulo (17%), Mato grosso do Sul (15%), Bahia (11%), Rio Grande do Sul (6%), Espírito Santo (4,1%) e Paraná (5,0%). Nos últimos cinco anos, o crescimento da área plantada de eucalipto foi de 2,8% a.a. (IBÁ, 2016).

Essa cultura era praticamente isenta de doenças até a década de 70. Porém, devido o avanço das áreas reflorestadas para regiões mais quentes e úmidas, o plantio de espécies mais suscetíveis e a utilização repetitiva de uma mesma área para plantio criaram condições favoráveis à ocorrência de doenças, sendo na sua maioria causada por fungos. Dentre essas, destaca-se o fungo, *Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halsted, causador de murchas e cancos. Este fungo foi detectado infectando viveiros, casa de vegetação, jardins clonais, (TUMURA et. al, 2012; FERREIRA et al., 2006).

Importância da doença

O gênero *Ceratocystis* é um grande e diversificado complexo de espécies que causam doenças do tipo murcha em muitas plantas economicamente importantes. Encontra-se presente em vários lugares do mundo e uma grande variedade de plantas anuais e perenes são infectadas por este fungo (HARRINGTON, 2009).

No Brasil, três espécies já foram identificadas: *C. paradoxa* infectando monocotiledônea, *C. cacaofunesta* causando grandes problemas em plantações de cacaueteiro (*Theobroma cacao*) (MAGALHÃES et al., 2016 e 2015) e *C. fimbriata* em mangueira (*Mangifera indica*) (BARKER et al. 2003) e eucalipto (*Eucalyptus spp*) (FERREIRA et al., 1999; FIRMINO e FURTADO, 2014). Também foi constatado a ocorrência desse fungo em acácia negra (*Acacia mearnsii*) (SANTOS e FERREIRA, 2003), batata doce (*Ipomoea batatas*) (BARNES et al., 2001), cafeeiro (*Coffea arabica*) (MARIN et al, 2003), citros (*Citrus spp*) (BORJA et al., 1995), figueira (*Ficus carica*) (VALARINI e TOKESHI, 1980), gmelina (RIBEIRO, 1982), seringueira (*Hevea brasiliensis*), (SILVEIRA et al., 1994), *Annonas squamosa* (SILVEIRA et al., 2006), teca (*Tectona grandis*) (FIRMINO et al., 2012), kiwi (*Actinidia deliciosa*) (PIVETA et al., 2013), andiroba (*Carapa guianensis*) (HALFELD-VIEIRA et al., 2012), atemóia (híbrido *Annona cherimola* X *A. squamosa*) (FIRMINO et al., 2010 e 2012) e maracujazeiro (*Passiflora edulis*) (FIRMINO et al., 2016).

Até meados de 1990, *C. fimbriata* causou grandes prejuízos em plantações de mangueira (*Mangifera indica*) (FIRMINO, 2011). Em 1997, sua ocorrência foi constatada pela primeira vez em plantações comerciais de eucalipto no sudeste da Bahia, causando mortalidade de plantas superior a 40%. No primeiro ano de observação, a enfermidade limitava-se a plantações monoclonais de dois genótipos, posteriormente três outros genótipos foram infectados. A doença também manifestou nas hastes de brotações em banco clonal destinados ao enraizamento em casa de vegetação e em mudas na fase de aclimação em viveiros. Com passar do tempo, 10 clones em quatro estados brasileiro apresentavam a infecção. (FERREIRA et al., 2006).

Ceratocystis fimbriata já se encontra estabelecido em eucalipto no Espírito Santo, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo, Maranhão e Pará (ALFENAS et al., 2009; FERREIRA, 2009). *Ceratocystis* é um típico patógeno de xilema, cujo sintoma marcante é constatável nas seções transversais de órgãos lenhosos, na forma de estrias radiais escuras. Este fungo penetra na planta por ferimento no tronco e nas raízes, atingindo o lenho via parênquima medular. Infecta desde o viveiro até plantas adultas (FIRMINO, 2011; ROSADO, 2009; FERREIRA et al., 2006; FERREIRA e MILANI, 2002).

Normalmente, uma planta infectada por *C. fimbriata*, apresenta como sintomas a perda de coloração verde-escura da folhagem, seguida de murcha e, conseqüentemente, seca das folhas e morte da planta (FIRMINO, 2011). Os sintomas surgem devido ao impedimento da expansão dos vasos pelo crescimento micelial do fungo e produção de esporos, impossibilitando que a água absorvida pelo sistema radicular chegue até a parte aérea da planta. Em condições favoráveis a planta morre e o fungo passa a se desenvolver nos tecidos em decomposição sobre o qual realiza sua reprodução através da formação de esporos e estruturas de resistência (clamidósporo) (FALAVESSA, 2014). Esses sintomas podem ser observados de formas e intensidades diferentes conforme o clone de eucalipto utilizado, a forma de inoculação artificial empregada, e o grau de resistência à doença do eucalipto em estudo (ZAUZA et al., 2004).

Em plantas hospedeiras o sintoma de murcha e seca ocorre devido a mecanismos de defesa que bloqueiam os vasos condutores (xilema e floema), formando tiloses, que são uma extensão do protoplasma das células do parênquima para o interior dos vasos do xilema, além de acúmulo de gomas ou géis. Tumura (2011), ao realizar cortes semifinos dos vasos de plantas de eucaliptos sadios e infectados com *Ceratocystis*, notou a presença de tiloses somente nas plantas infectadas. Vieira (2015) constatou a presença de tilose em corte histopatológico obstruindo o vaso do xilema no clone CO 1407.

O fungo é incapaz de penetrar diretamente através da epiderme do ramo sadio, o qual oferece forte barreira mecânica, necessitando, portanto, de um vetor ou de ferimentos. Uma vez no interior da planta, seu desenvolvimento inicial dá-se na região do câmbio, entre a casca e o lenho e com o passar do tempo avança para o interior do cerne nos tecidos em decomposição sobre o qual realiza sua reprodução por meio da formação de esporos e estruturas de resistência (clamidósporos) (BEDENDO, 2011).

Disseminação de *Ceratocystis fimbriata*.

Ceratocystis fimbriata pode ser disseminado por ferimentos causados por ferramentas utilizadas nos tratos culturais, mudas contaminadas e por insetos. Essa relação inseto/fungo é facilitada pelo fato da maioria das espécies de *Ceratocystis* produzirem aromas que atraem os insetos. Ferreira (2004) sugeriu a dispersão do patógeno pelo homem para várias regiões eucaliptocultoras. Este autor examinou árvores no campo e observou a infecção do fungo via inóculo no solo. Coleobrocas (*Scolytidae*) ao se alimentarem adquirem o inóculo do fungo e dispersam para plantas suscetíveis, principalmente por serragem contaminada. Também,

verificou-se que besouros *Ambrosia* carregam esporos sobre o corpo, os quais podem sobreviver ao trato digestivo desse inseto (FERREIRA, 2009).

Ferreira et al. (2006) inspecionaram 10 clones pertencentes a oito empresas eucaliptocultoras afetadas por *C. fimbriata*. Verificaram que duas plantas apresentaram perfurações de inseto da família *Platybodidae* nas lesões longitudinais. Nas plantas vizinhas não foram observadas perfurações de insetos nas lesões novas, sendo interpretado que a associação de insetos somente em lesões mais velhas são uma forma secundária ou não precursora da doença. Entretanto ao saírem das galerias do lenho infectado, os insetos podem transmitir endoconídios e clamidósporo do fungo para outras plantas com xilema alterado por estresse abiótico ou biótico.

A dispersão natural de *Ceratocystis* para novos continentes é um evento raro. Essa movimentação de propágulos do fungo para novas regiões pode ocorrer através de material propagativo infectado ou madeira maciça usada para embalagens. Estudos com isolados de *Ceratocystis* de batata-doce da China, Japão, Papua Nova Guiné, Nova Zelândia e Estados Unidos não mostraram variação genética em sua sequência de DNA da região ITS, e baixa variação quando se usa marcadores microssatélites, provavelmente um único isolado do fungo foi transferido para todo o mundo em raízes utilizadas para propagação (HARRINGTON et al., 2011; BAKER et al., 2003). Além de registros sobre a disseminação de *Ceratocystis* ssp. pelo contato entre as raízes de mangueira, plátano e eucalipto (BAKER e HARRINGTON, 2004).

Resistência a *Ceratocystis*.

Para eucalipto, ainda não há relatos de fontes de resistência ao *C. fimbriata* (FIRMINO, 2011). Segundo Alfenas et al. (2009), há indícios de que *Eucalyptus grandis* tenha nível de resistência diferente do *E. urophylla*. O primeiro estudo visando resistência ao *C. fimbriata* foi realizado por Zauza et al. (2004). Esses autores trabalharam com 18 clones brasileiros, híbridos do cruzamento entre *E. grandis* x *E. urophylla*. Os clones C15, C16, C17 e C18 se comportaram como resistentes, C13 e C14 apresentaram resistência moderada, C1, C7, C9, C4, C3 e C6 foram altamente suscetíveis, e, os demais clones apresentaram suscetibilidade intermediária. Os clones que apresentaram alta susceptibilidade têm muitas características superiores em relação aos clones resistentes testados, como alta produtividade de celulose, rápido crescimento, queda precoce de ramos e resistência ao cancro causado por *Cryphonectria cubensis*. Este fato é preocupante, pois essas características os tornam clones elite, sendo estes os mais procurados pela indústria madeireira (FIRMINO, 2011).

Magalhães et al. (2016) estudaram um método de discos foliares visando a identificação da resistência em cacaueiro (*Theobroma cacao*). Foi feito um corte na nervura central, na parte adaxial dos discos e colocaram uma gota (20 µL, 3×10^4 CFU/ mL) de suspensão de esporos de *Ceratocystis cacaofunesta*) e após quatro dias de incubação o número de peritécio formado foi avaliado. Os resultados encontrados nesse método foram similares em suscetibilidade e resistência à metodologia em campo, conseguindo esses autores diferirem pelo método de disco foliar clones suscetíveis e resistentes. O clone de eucalipto testado neste método foi suscetível ao *C. cacaofunesta*. Portanto, os autores sugerem o uso desse método para outros hospedeiros de *Ceratocystis sp.*

Em estudos realizados com o objetivo de encontrar fontes de resistência de eucalipto ao *Ceratocystis*, verificou-se que em plantas inoculadas, as quais tinham seu tecido invadido pelo fungo, porém assintomáticas, ou seja, com ausência de sintomas de murcha e de mortalidade, tinham seus tecidos invadidos pelo fungo quando realizados cortes longitudinais nos caules analisados (TUMURA et al., 2012, ZAUZA et al., 2004). Plantas infectadas são fontes de inoculo primário para uma epidemia em campo. Isto mostra a necessidade de se encontrar um método ideal para se avaliar a resistência ao *C. fimbriata*, em eucalipto de forma rápida e não destrutiva.

Estratégia de resistência da planta ao *Ceratocystis fimbriata*

A resistência do hospedeiro a um microrganismo patogênico pode ser definida, sob o aspecto fisiológico, como a capacidade da planta em atrasar ou evitar a entrada e/ou a subsequente atividade do patógeno em seus tecidos (PASCHOLATI et al., 2008). Essa complexidade funcional, espacial e temporal inicia-se com o reconhecimento de sinais exógenos provenientes do patógeno, continua com os mecanismos de transdução desses sinais e resulta em extensa reprogramação do metabolismo celular vegetal, envolvendo mudanças na atividade gênica (WALTERS et al., 2007).

Os mecanismos de defesa de uma planta podem ser estruturais e bioquímicos, ambos pré e/ou pós-formados em relação à tentativa de penetração do patógeno no hospedeiro. Os mecanismos estruturais constituem-se em barreiras físicas à penetração e/ou a colonização do patógeno, enquanto os mecanismos bioquímicos englobam substâncias capazes de inibir o desenvolvimento do patógeno ou gerar condições adversas para a sobrevivência nos tecidos do hospedeiro. Devem estar presentes em concentração adequada nas partes invadidas e em forma acessível ao patógeno, de tal maneira que mudanças na concentração da(s)

substância(s) implicam em mudanças na expressão da doença (SCHWAN-ESTRADA et al., 2008).

Os mecanismos de resistência pré-formados (passivos ou constitutivos) estruturais são formados pela cutícula, tricomas, estômatos e fibras/vasos condutores, enquanto os bioquímicos são constituídos pelos fenóis, alcalóides glicosídicos, lactonas insaturadas, glicosídeos: fenólicos e cianogênicos, inibidores proteicos, quitinases e β -1,3 glucanases. Os de resistência pós-formados (ativos ou induzíveis) estruturais por papilas, halos, lignificação, glicoproteínas ricas nos aminoácidos hidroxiprolina (HRGP) e glicina (GRP), camadas de cortiça, camadas de abscisão, tiloses, gomas ou géis (PASCHOLATI e LEITE, 1995).

Vários tipos de gomas ou géis são produzidos por diversas plantas próximo das lesões causadas por patógenos ou injúrias (AGRIOS, 2005). Como mecanismo de resistência algumas plantas depositam gomas ou géis, composto de pectinas produzidas nas células do parênquima adjacentes aos vasos do xilema. Estas gomas ou géis ocupam o lúmen do xilema impedindo o fluxo de seiva, incluindo deposição nas pontuações, evitando a passagem de água próximo área afetada pelo patógeno (SUN et al., 2008).

Quantificação de doenças

A quantificação de doenças de plantas, também denominada fitopatometria, visa avaliar os sintomas das doenças nas plantas e estrutura dos patógenos associados aos tecidos doentes. Podem ser quantificadas por métodos diretos de avaliação de incidência ou severidade.

A severidade é um método que procura determinar a porcentagem da área de tecido doente (sintomas/ e ou sinais visíveis), por meio da medição direta da área afetada com medidores de área em computador, ou por meio de chaves descritivas, medição automática e sensores remotos. Apresenta como vantagens ser mais precisa, expressando o dano real causado pelos patógenos; caracteriza melhor o nível de resistência a um patógeno e expressa com maior fidelidade a intensidade da doença no campo e os danos causados (LIBRELON, 2015).

O método empregado para estudo de resistência em eucalipto para *murcha-de-Ceratocystis* é a inoculação de mudas de eucalipto em estufa. Este método tem como desvantagem a destruição das plantas, exige que as mudas atinjam certo diâmetro (1,5 cm), levando de 60 a 120 dias para a inoculação (MAGALHÃES et al, 2015; FIRMINO et al., 2013; TUMURA et al., 2012; MAFIA et al., 2011; ROSADO, 2009; ZAUZA et al., 2004; BAKER et al, 2003). Contudo, esta metodologia requer a destruição das plantas avaliadas,

longo tempo após a infecção para avaliar a reação dos clones, infraestrutura, condições controladas e mão de obra especializada. Contudo, novas metodologias de avaliação da resistência ao *Ceratocystis* em diferentes patossistemas têm sido propostas, visando à avaliação precoce e não destrutiva de plantas infectadas pelo fungo. Sendo vantajosa por ser rápida, não destrutiva, pouco laboriosa, não demandar casa de vegetação nem a produção de mudas exclusivas para as avaliações fenotípicas, e ainda podendo testar a resistência de um maior número de clones por vez (MAGALHÃES et al., 2016; MARQUES, 2013)

Quando as plantas são atacadas por patógenos, vários processos fisiológicos, como a fotossíntese (condutância estomática, transpiração e concentração interna celular e do ambiente) e a translocação de água e nutrientes, são negativamente comprometidos. Alguns estudos mostraram que os ataques de patógenos reduzem a fotossíntese devido a danos à maquinaria fotossintética, consequentemente afetam a altura, o dossel e o comprimento das raízes na planta (TATAGIBA et al., 2015, FALLAVESSA, 2014; DALLAGNOL et al., 2011. PSHIBYTKO et al., 2006).

Estudos anatômicos da madeira com o fungo *Ceratocystis fimbriata* em eucalipto evidenciaram a ação dos mecanismos de resistência (tilose, gomas ou espessamento da parede de fibras, lignificação micelial e formação de compostos fenólicos na contenção da infestação da planta pelo patógeno) conforme Tumura (2011); Vieira (2015).

O setor de árvores plantadas contribuiu com 3,0% do PIB (IBA, 2016). Dentre os setores que utilizam os produtos originários das florestas de eucalipto, destaca-se o setor de papel celulose e o setor siderúrgico, que utiliza o carvão vegetal para gerar energia. A indústria de celulose é a mais afetada pela infecção do *C. fimbriata* em eucalipto, e as plantas que sobrevivem à infecção do fungo apresentam uma redução de 20% da produtividade, afetando o setor de produção de carvão. O escurecimento provocado pelo desenvolvimento do fungo no caule da planta eleva o custo do branqueamento da celulose (FERNANDES et al., 2014; MAFIA et al., 2013). Portanto, a identificação de diferentes fontes de resistência ao *Ceratocystis* é de grande importância e poderá ser utilizada em programas de melhoramento genético.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrios, G. N. 2005: Plant pathology. San Diego: Elsevier Academic Press, (5nd. ed.). 922p.
- Alfenas, A. C.; Zauza, E. A. V.; Mafia, R. G.; Assis, T. F. 2009: Clonagem e doenças do eucalipto. (2nd ed.). Editora UFV. Viçosa, Brasil.
- Baker, G. J.; Herrington, T. C.; Kraus, U.; ALFENAS, A. C. 2003: Genetic variability and host specialization in the Latin American clade *Ceratocystis fimbriata*. *Phytopathology*, 93, 1274-1284.
- Baker, C. J. e Harrington, T. C. 2004: *Ceratocystis fimbriata*. In: _____. Crop protection compendium. CABI Publishing. Kew, Surrey
- Barnes, I.; Gaur, A.; Burgess, T.; Roux, J. 2001: Wingfeld, B. D.; Wingfeld, M. J. Microsatellite markers reflect intra-specific relationships between isolates of the vascular wilt pathogen *Ceratocystis fimbriata*. *Molecular Plant Pathology*, 2, 319-325.
- Bedendo, I. P. 2011: Doenças vasculares. In: Amorim, L.; Bergamin Filho, A.; Kimati, H (Eds.). Manual de fitopatologia: princípios e conceitos, (3nd ed.), Editora Ceres, São Paulo, Brasil.
- Borja, D. C.; Caycedo, J. E. L.; Ríos, J. A. L. 1995: El secamiento de los citricos em la zona cafetera central. *Cenicafé Avances Tecnicos*, Colombia, 212, 1-8.
- Dallagnol, L. J.; Rodrigues, F. A.; Martins, S. C. V.; Cavate, P. C.; DaMatta, F. M. 2011: Alterations on rice leaf physiology during infection by *Bipolaris oryzae*. *Journal of the Australasian Plant*. 40, 360-365.
- Falavessa, M. 2014: Impacto das mudanças climáticas na resistência de clones de eucalipto a *Ceratocystis fimbriata*. 61 p. Dissertação (Mestre em Ciências Florestais)- Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória. 2014.
- Fernandes, B. V.; Zanuncio, A. J. V.; Furtado, E. L.; Andrade, H. B. 2014: Damage and losses due to *Ceratocystis fimbriata* in *Eucalyptus* wood for charcoal production. *Bioresources*, 9, 5473-5479.
- Ferreira, M. A. 2009: Tese (Doutorado em Fitopatologia). Estrutura Genética de

- populações e padrão espaço-temporal da murcha-de-ceratocystis.
Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2009.
- Ferreira, F. A.; Maffia, L. A.; Barreto, R. W.; Demuner, N. L.; Pigatto, S. 2006:
Sintomatologia da murcha de *Ceratocystis fimbriata* em eucalipto. Revista
Árvore, 30, 155-162.
- Ferreira, F. A. e Milani, D. 2002: Diagnose visual e controle das doenças abiótica e
bióticas do eucalipto no Brasil. Mogi Guaçu. International Paper. 104.
- Ferreira, F. A. 2004. Etiologia da murcha de *Ceratocystis fimbriata* em eucalipto no
Brasil. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa.
- Firmino, A. C.; Furtado, E. L. Fische, I. H.; Antonio, G. L.; Novaes, Q. S.; Tozze Júnior,
H. J.; Furtado, E. L. 2016: Characterization of *Ceratocystis fimbriata* from passion
Fruits. Arquivo do Instituto Biológico. São Paulo, 8, 1-7.
- Firmino, A. C.; Tanaka, F. A. O.; Silva, S. D. V. M.; Ito, M.F.; Furtado, E. L. 2015:
Colonização do xilema de eucalipto por *Ceratocystis* spp isolado de diferentes
hospedeiros. Summa Phytopathologica. Botucatu, 41, 138 - 146.
- Firmino, A. C.; Furtado, E. L. 2014: Produção de enzimas extracelulares por *Ceratocystis*
spp. Summa Phytopathology. Botucatu, 40, 371-374.
- Firmino, A. C; Junior, H. J. T.; Souza, I. C. G. D. E.; Furtado, E. L. 2013: Resistência de
genótipos de Eucalipto a *Ceratocystis* sp. Scientia Forestalis, 41,165-173.
- Firmino, A. C.; Júnior; H. J. T.; Costa, P. N.; Furtado, E. L. 2012: *Ceratocystis fimbriata*
causando seca em atemóia na região de Botucatu-SP. Summa Phytopathologyca,
Botucatu. 38, 171-171.
- Firmino, A. C. Caracterização de isolados de *Ceratocystis* sp., avaliação de resistência
clonal de eucalipto e sensibilidade deste fungo a diferentes fungicidas. 2011.
Tese (Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas) - Faculdade de Ciências
Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista. Botucatu. 2011.
- Firmino, A. C.; Júnior; H. J. T.; Costa, P. N.; Furtado, E. L. 2010: *Ceratocystis* sp. causando
murcha em atemóia na região de Botucatu - SP. Tropical Plant Pathology, Brasília,
35, 236.

- Fonseca, S. B. Resende, M. D. V., Alfenas, A. C., Guimarães, L. M. S., ASSIS, T. F., Grattapaglia, D. 2010: Manual prático de melhoramento genético do eucalipto. Ed. Viçosa. Viçosa, 200.
- Halfeld-Vieira, B. A. First record of *Ceratocystis fimbriata* on *Carapaguianensis*. 2012: New Disease Reports. 26, 13.
- Harrington, T. C.; Torphe, D. J.; Alfenas, A. C. 2011: Genetic variation and variation in aggressiveness to native and exotic hosts among Brazilian populations of *Ceratocystis fimbriata*. Phytopathology. 101, 555 – 566.
- Harrington, T. C. 2009: The genus *Ceratocystis*. Where does the oak wilt fungus fit?. National oak wilt symposion. Texas.
- Indústria Brasileira de Árvores (IBÁ). 2016: Desempenho das árvores plantadas. 4. 96.
- Librelon, S. S.; Souza, E. A.; Pereira, R.; Pozza, E. A.; Abreu, A. F. B. 2015: Diagrammatic scale to evaluate angular leaf spot severity. Australasian Plant Pathology, 44, 385-395.
- Mafia, R. G.; Ferreira M. A; Zauza E. A. V.; Silva J. F.; Colodette J. L.; Alfenas A. C. 2013: Impact of *Ceratocystis* wilt on eucalyptus tree growth and cellulose pulp yield. Forest Pathology, 1-7.
- Mafia, R. G.; Alfenas A. C.; Ferreira, E. A.; Binot, D. H. B. 2011: Método de seleção e identificação de fontes de resistência à murcha do eucalipto causada por *Ceratocystis fimbriata*. Revista Árvore: Viçosa, v.35, n.4, p.817-824.
- Magalhães, D. M. A.; Luz, E. D. M. N.; Lopes, U. V.; Niella, A. R. R.; Damaceno, V. O. 2016: Leaf disc method for screening *Ceratocystis* wilt resistance in cacao cacao. Tropica Plant Pathology. 41, 155–161.
- Magalhães, D. M. A.; Luz, E. D. M. N.; Lopes, U. V.; Silva, S. D. V. M.; Damaceno, V.O.; Niella, A. R. R.; 2015: A New method for early detection on *Ceratocystis* spp. on various hosts. Agrotópica, Ilhéus. 27, 209 – 214.
- Marin, M.; Castro, B.; Gaitan, A.; Preisig, O.; Wingfield, B. D.; Wingfield, M. J. 2003: Relationships of *Ceratocystis fimbriata* isolates from Colombian Coffee-Growing regions based on molecular data an pathogenicity. Journal of Phytopathology. 151, 395-405.
- Marques, A. Identificação de genes diferencialmente expressos em híbridos de *Eucaliptus*

- inoculados com isolados de *Ceratocystis fimbriata*. 2013. Dissertação (Mestre em Ciência Florestal)- Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. Diamantina, 2013.
- Oliveira, L. S. S.; Guimarães, L. M. S.; Ferraira, M. A.; Nunes, A. S.; Pimenta, L. V. A., Alfenas, A. C. 2015: Aggressiveness, cultural characteristics and genetic variation of *Ceratocystis fimbriata* on *Eucalyptus* spp. *Forest. Pathology*, 45, 505–514.
- Pascholati, S. F.; Leite, B.; Stangarlin, J. R.; Cia, P. 2008: Interação Planta Patógeno fisiologia, bioquímica e biologia molecular. Piracicaba: FEALQ, 1, 627.
- Pascholati, S. F.; Leite, B. 1995: Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: Bergamin Filho, A. Kimati, H.; Amorim, L. *Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos*. Ceres, São Paulo. (3 nd ed), 1, 417-452.
- Piveta, G.; Alfenas, A. C.; Muniz, M. F. B.; Valdebenito-Sanhueza, R. M.; Ferreira, M. A. 2013: Ocorrência de *Ceratocystis fimbriata* em kiwi (*Actinidia deliciosa*) no sul do Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal*. 35, 665-669.
- Pshibytko, N. L.; Zenevich, L. A.; Kabashnikova, L. F. 2006: Changes in the photosynthetic apparatus during *Fusarium* wilt of tomato. *Russian Journal Plant Pathology*, Moscou, 53, 25-31.
- Ribeiro, G. T. 1982: Avaliação preliminar da resistência de árvores de *Gmelina arborea* Lineaus, mediante inoculações do fungo *Ceratocystis fimbriata* Ell.; Halst., causador do cancro em gmelina. *Fitopatologia Brasileira, Brasília*, 7, 517.
- Rosado, C.C.G; Guimarães, L. M. S.; Faria, D. A.; Resende, M. D. V.; Cruz, C. D.; Grattapaglia, D.; Alfenas, A. C. 2016: QTL mapping for resistance to *Ceratocystis* wilt in *Eucalyptus*. *Tree Genetics & Genomes*. 12, 62-72.
- Rosado, C.C.G; Guimarães, L. M. S.; Titon, M.; Alfenas, A. C. 2010: Resistance to *Ceratocystis* Wilt (*Ceratocystis fimbriata*) in Parents and Progenies of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. *Silvae Genetica*, 59, 99–106.
- Rosado, C.C.G. Genética da resistência à murcha-de-*Ceratocystis* (*Ceratocystis fimbriata*) em *Eucalyptus*.spp. 2009. Dissertação (Mestre em Ciências Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa. Viçosa. 2009.

- Santos, A. F.; Ferreira, F. A. 2003: Murcha de *Ceratocystis* em acácia-negra no Brasil. Fitopatologia Brasileira, 28, 325. 2003.
- Schwan-Estrada, K. R. F.; Stangarlin, J. R.; Pascholati, S. F. 2008: Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In: Pascholati, S. F.; Leite, B.; Stangarlin, J. R.; Cia, P. (ed.). Interação Planta Patógeno – fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular. Piracicaba: FEALQ, 227-248.
- Silveira, S. F.; Harrington, T. C.; Mussi-Dias, V.; Engelbrecht, C. J. B.; Acelino C. Alfenas, A. C.; Silva, C. R. 2006: *Annona squamosa*, a new host of *Ceratocystis fimbriata*. Fitopatologia Brasileira, Brasília. 31, 394-397.
- Silveira, A. P.; Oliveira, D. A.; Cardoso, R. M. G.; Neto, F. B.; Ortolani, A. A.; Godoy, G. 1994: Caracterização do prejuízo provocado pelo mofo cinzento (*Ceratocystis fimbriata*) em painéis de seringueira (*Hevea brasiliensis*). Summa Phytopathologica. 20, 96-199.
- Sistema Nacional de Informações Florestais (SNIF). 2016: As Florestas plantadas. < <http://www.florestal.gov.br/snif/recursos-florestais/as-florestas-plantadas> > Acesso: out. 2016.
- Sun, Q.; Rost, T. L.; Mathews, M. A. 2008: Wound-induced vascular occlusions in vitis vinifera (*Vitaceae*): tyloses in summer and gels in winter. American Journal of Botany. 95, 1498–1505.
- Tatagiba, S. D.; Pezzopani, J. E. M.; Reis, E. F. 2015: Fotossíntese em eucalyptus sob diferentes condições edafoclimáticas. Engenharia na agricultura, Viçosa. 23, 336-345.
- Tumura, K.G. Avaliação de resistência, análise epidemiológica e caracterização anatômica da madeira em clones de *Eucalyptus* sp infectado por *Ceratocystis fimbriata*. 2011. Dissertação (Mestre em Ciências Florestais) – Faculdade de Ciências Agrônômicas UNESP. Botucatu. 2011.
- Tumura, K. G.; Piere, C. D.; Furtado, E. L. 2012: Murcha por *Ceratocystis* em eucalipto: avaliação de resistência e análise epidemiológica. Summa Phytopathologica, 38, 54-60.

- Valarini, P. J. e Tokeshi, H.: 1980. *Ceratocystis fimbriata*: agente causal da seca da figueira e seu controle. Summa Phytopathologica, Botucatu, 6, 102-106.
- Viera, P. M. Identificação de marcadores de genes de resistência a patógenos em eucalipto e soja por RGA. 2015. Dissertação (Mestre em Genética e Melhoramento) Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória. 2015.
- Zauza, E. A. V.; Alfenas, A. C.; Harrington, T. C.; Mizubuti, E. S.; Silva, J. F. 2004: Resistance of *Eucalyptus* clones to *Ceratocystis fimbriata*. Plant Disease, Saint Paul, 88, 758-760.
- Walter, D.; Newton, A.; Lyon, G. 2007. Induced resistance for plant defence – a sustainable approach to crop protection. Oxford: Blackwell, 258.

CAPÍTULO 1:

Resistência à *Ceratocystis fimbriata*: detecção precoce e não destrutiva em *Eucalyptus*

Ceratocystis fimbriata to resistance: early and non-destructive detection in *Eucalyptus*

Regina Gonçalves dos Santos Oliveira¹, Willian Bucker Moraes², Liana Hilda Golin Mengarda¹, Adésio Ferreira^{1,2}, Marcia Flores da Silva Ferreira^{1,3*}

Universidade Federal do Espírito Santo, ¹Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Centro de Ciências Agrárias e Engenharia, ²Departamento de Agronomia, CCAE, UFES - Alegre, Espírito Santo, Brasil, ³Departamento de Biologia.
E-mail: marcia.ferreira@ufes.br (autor para correspondência).

Artigo a ser enviado para revista Forest Pathology

RESUMO

A murcha causada por *Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halsted é uma das principais doenças em plantios comerciais de eucalipto. Os principais sintomas são murcha, cancro, escurecimento do cerne e morte da planta. O uso de clones de eucalipto resistentes é a melhor alternativa de controle. Sendo assim, objetivo deste estudo foi o desenvolvimento de um método de detecção fenotípica precoce e não destrutiva em plantas de eucalipto infectadas com *Ceratocystis fimbriata*. Foram utilizadas mudas de quatro clones comerciais, com seis meses de idade: AEC 1528, BA 7346, CO 1407, BA 6021. Sendo inoculados 0,1 ml da suspensão $2,5 \times 10^6$ esporos mL^{-1} do fungo, com seringa, na nervura mediana dos discos foliares ($\varnothing 2$ cm) de cada clone, acondicionados em placas de Petri com cinco repetições contendo 10 discos foliares. Para a comparação dessa metodologia de discos foliares foi feita a inoculação do fungo no caule dos clones (10 plantas por clone), com disco ($\varnothing 5\text{mm}$) de meio MEAY de cultura, colonizado pelo fungo. Para estes métodos, após inoculação a severidade da doença das plantas em função do tempo foi avaliada. Após seis dias nos discos foliares e após 50 dias no xilema, utilizando escala de frequência em moderadamente suscetível, suscetível, altamente suscetível, moderadamente resistente, resistente e altamente resistente. Os valores médios de severidade da doença por dia para cada genótipo nos discos foliares foram plotados em relação ao tempo e posteriormente calculada a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). Foi adotado o delineamento inteiramente casualizado (DIC). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) foi avaliada pelo teste F, em nível de 5% de probabilidade. A comparação entre as médias foi realizada pelo teste de Tukey (5% de significância), com auxílio do programa R e plotado em Boxplot, para ambos os métodos. Com base na metodologia de avaliação precoce foi possível distinguir clones suscetíveis de resistentes e os clones AEC 1528 mostrou-se resistente. Os clones CO 1407, BA 6021 e BA 7346 foram suscetíveis ao fungo *C. fimbriata*.

Palavras chave: murcha-de-*Ceratocystis*, resistência, xilema, fungo, patógeno, eucalipto

ABSTRACT

The ceratocystis wilt (*Ceratocystis fimbriata*) is currently, one of the most important diseases in commercial eucalypt plantation. The main symptoms are wiltings, canker and wood darkening and death of the plant. The use of resistant *Eucalyptus* genotypes is the best control method. The aim of this study was the development early phenotypic evaluation and non-destructive in plants infected in *Ceratocystis fimbriata* in *Eucalyptus* spp., on leaf disc method. Commercial clones were used: AEC 1528, BA 7346, CO 1407, BA 6021, 6- months-old years. The genotypes inoculated with 0,1 mL of the inoculum suspension (2.5×10^6 spores mL^{-1}) it using the syringe the midrib of the discs leaf per genotypes (Ø5 cm). After 6 days of inoculation, frequency scale was used and different resistance levels were found, since high resistance until high susceptibility. To compare this study was made in the genotype stems with disc (Ø5mm) MEAY medium colonized by the fungus in 10 plants per genotype, daily irrigated. For both methods, leaf disks and plants as control (fungal uninoculation) were used. It frequency scale was used and different resistance levels were found, since high resistance until high susceptibility, both methods after 6 and 50 days. Severity in leaf discs was calculated by area under the disease progress curve (AACPD). Clone BA 6021 presented the largest area of the curve. It was used a completely randomized designs (DIC) Data were analyzed by analysis of variance and means were compared by Tukey' test. Based on early method was possible to distinguish susceptible and resistant clones and AEC1528 clone showed resistant clones and CO 1407, BA 6021 and BA 7346 were susceptible to the fungus *Ceratocystis*.

Keywords: *Ceratocystis* wilt, xylem, resistance, fungal, pathogen, eucalyptus.

INTRODUÇÃO

O plantio de eucalipto é cultivado em mais de 100 países, representando grande importância econômica (FONSECA, 2010) e as técnicas relacionadas à cultura têm conseguido avanços tecnológicos expressivos. A diversidade de espécies e clones confere à cultura variabilidade genética, possibilitando adaptação a diversas condições edafoclimáticas e atendendo a inúmeros tipos de explorações econômicas. Contudo, a cultura do eucalipto sofre prejuízos com ataque de pragas e doenças, entre as quais a murcha-de-*Ceratocystis* (FERREIRA et al., 2011).

O *Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halsted é considerado um fungo importante na cultura de eucalipto em condições de campo. O patógeno provoca escurecimento no cerne da planta causando prejuízos na produção papel e celulose. O uso da madeira com o fungo eleva o custo do branqueamento da celulose, demandando maiores quantidade de soda no processo, menor produção de celulose e maior consumo específico de madeira (MAFIA et al., 2013; ARAUJO et al., 2007). No setor produtivo de carvão, o fungo causa redução do rendimento da produção (FERNANDES et al., 2014).

O *C. fimbriata* tem ampla distribuição geográfica e grande gama de hospedeiro, que inclui várias famílias de plantas distribuídas em 41 países (HARRINGTON et al., 2011, VAN WYK et al., 2011). O gênero *Ceratocystis* é reconhecido como um complexo de espécies capaz de causar sintoma de murcha em plantas lenhosas, principalmente *Eucalyptus* spp. (ROSADO et al., 2016; FERNANDES et al., 2014; TUMURA et al., 2012; HARRINGTON et al., 2011). A murcha-de-*Ceratocystis* em eucalipto é uma doença sistêmica, que infecta os tecidos vasculares, principalmente o xilema, ocasionando escurecimento do lenho. Cortes perpendiculares no caule evidenciam o sintoma típico da doença (ALFENAS et al., 2009). Com a progressão sistêmica do patógeno surgem lesões externas ao tronco, marrom-avermelhadas, coriáceas, contínuas ou interrompidas (OLIVEIRA et al., 2015; FERREIRA et al., 2006). As plantas infectadas murcham e suas folhas tendem a permanecer presas aos ramos (ROSADO et al., 2016). Além do baixo desenvolvimento da planta infectada, podem surgir brotações ao longo do fuste, bem como a morte de ponteiros e da planta (FIRMINO et al., 2015).

O plantio de clones resistentes é a forma mais eficiente de controle de *C. fimbriata* em eucalipto (ROSADO et al., 2016; FERNANDES et al., 2014; ZAUZA et al., 2004), entretanto a herança genética da resistência é pouco conhecida e diferentes estudos visam a identificação de fontes de resistência em *Eucalyptus* (ROSADO et al., 2016; 2010), visando uma forma

efetiva de manejo e melhoramento genético. Nesse contexto, Zauza et al. (2004) avaliaram dez híbridos de *E. grandis* × *E. urophylla*, quanto à infecção a dois isolados do fungo e identificaram quatro genótipos resistentes. Firmino et al. (2013) avaliaram genótipos de diferentes espécies (*E. grandis*, *E. urophylla*, *E. saligna*, *E. grandis* × *E. urophylla*, *E. grandis* × *E. dunni* e *E. grandis* × *E. smithii*) quanto à resistência a 20 isolados e identificaram cinco genótipos resistentes. Tumura et al. (2012) estudaram 37 clones de duas procedências e encontraram material desde altamente resistente até altamente suscetível.

Nos estudos visando avaliar e selecionar clones de eucalipto quanto à resistência ao *C. fimbriata*, é a inoculação do fungo no tecido condutor da planta no caule, para posterior avaliação do comprimento da infecção no xilema entre 30 e 120 dias após a infecção (MAGALHÃES et al., 2015; FIRMINO et al., 2013; TUMURA et al., 2012; MAFIA et al., 2011; ROSADO, 2009; ZAUZA et al., 2004; BAKER et al., 2003). Com tudo, essa metodologia requer a destruição das plantas avaliadas, longo tempo após a infecção para avaliação, estrutura física como: casa de vegetação e condições controladas. Além disto, podem ocorrer variações nos resultados do comprimento da infecção no xilema nas repetições de um mesmo clone, pois a extensão da penetração do fungo pode ocorrer de forma irregular (MAFIA et al., 2011).

Novos protocolos de avaliação da resistência a *Ceratocystis* spp. têm sido propostos em diferentes patossistemas, visando a avaliação precoce e não destrutiva de plantas infectadas pelo fungo. Magalhães et al. (2015) desenvolveram uma metodologia de avaliação fenotípica em folhas, realizada entre quatro e sete dias após a infecção, utilizando diferentes hospedeiros (cacau, eucalipto, seringueira, graviola, pinha, coqueiro e café), dos quais isolou o fungo. Posteriormente, Magalhães et al. (2016) relataram sucesso na identificação de clones resistentes de cacau usando discos foliares para *screening* de murcha de *Ceratocystis*, baseados na metodologia proposta por Nyassé et al. (1995) que, por sua vez, avaliaram a resistência do cacau ao *Phytophthora palmivora* e *P. megakarya*.

A avaliação da infecção em discos foliares é vantajosa por ser rápida, não destrutiva, pouco laboriosa, e por não demandar casa de vegetação nem a produção de mudas exclusivas para as avaliações fenotípicas. Este tipo de metodologia, entretanto, ainda não foi avaliada para seleção de genótipos resistentes ao *Ceratocystis fimbriata* em *Eucalyptus*. Metodologias precoces e não destrutivas têm especial importância para estudos de melhoramento visando obter genótipos resistentes, uma vez que a manutenção das plantas vivas é imprescindível para a avaliação de populações experimentais, especialmente em plantas perenes como é o caso do eucalipto.

Nesse contexto, objetivou-se avaliar um método de detecção fenotípica precoce, rápida e não destrutiva, da infecção por *C. fimbriata* em híbridos interespecíficos de *E. grandis* x *E. urophylla*, por meio da utilização de discos foliares.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e inóculo

Os experimentos foram realizados no Setor de Fitopatologia-NUDEMAFI/ DAG/ CCAE e Laboratório de Ciência da Madeira/DCFM- Universidade Federal do Espírito Santo, em agosto de 2016. Foram utilizados clones de quatro híbridos de *E. grandis* x *E. urophylla*: BA 6021, CO 1407, AEC 1528, BA 7346. As mudas com três meses de idade foram adquiridas dos viveiros comerciais das empresas Ducampo, Linhares - ES e Pro Mudas Sul Minas Ltda, Lavras - MG. As mudas foram transplantadas para vasos de 10L, com mistura de terra, areia e substrato comercial orgânico Bioplant (3:1:1), irrigadas diariamente, adubadas aos 30 e 60 dias após transplântio e mantidas em casa de vegetação até seis meses de idade, quando foram inoculadas com o fungo.

O isolado de *Ceratocystis fimbriata* utilizado (PF5) foi obtido de um híbrido (*E. grandis* x *E. urophylla*) da região de Curvelo, MG, em junho de 2011. Foi proveniente da Micoteca do Departamento de Fitopatologia, UFLA-MG e cedido pela Profa Dra Maria Alves Ferreira. Para o isolamento e multiplicação de esporos, o fungo foi isolado em meio de cultura MYEA (2% de extrato de malte, 0,2 % de extrato de levedura e 2% de ágar) distribuído em placas de Petri. As placas foram acondicionadas em sala climatizada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, com 24 horas de luz até total preenchimento da placa.

Avaliação fenotípica em discos foliares

Para a avaliação fenotípica utilizada a metodologia em discos foliares, foi obtida uma suspensão de esporos, adicionando-se água esterilizada em placas com *C. fimbriata* e realizada uma raspagem sobre as colônias do fungo com auxílio de uma alça de Drigalsky. A suspensão de esporo foi filtrada em camada dupla de gaze e sua concentração foi ajustada em câmara de Neubauer para $2,5 \times 10^6$ esporos mL^{-1} (LAIA et al., 2000). Foi inoculado 0,1 mL da suspensão, com auxílio de uma seringa esterilizada, próximo a nervura principal, na face adaxial, no centro de cada disco foliar ($\varnothing 2$ cm) e colocados em placas de Petri com papel de filtro umedecido com água destilada e esterilizada. Nos discos foliares usados como controle de cada clone foi realizada inoculação com água destilada e esterilizada. As placas com discos foram acondicionadas em câmara climatizada por cinco dias a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, e 12 horas de

fotoperíodo (Figura 1). O delineamento foi inteiramente casualizado com cinco repetições e cada repetição foi constituída de uma placa de Petri (14 cm x 2 cm), com 10 discos foliares, totalizando 50 discos por genótipo (Figura 1a-b).

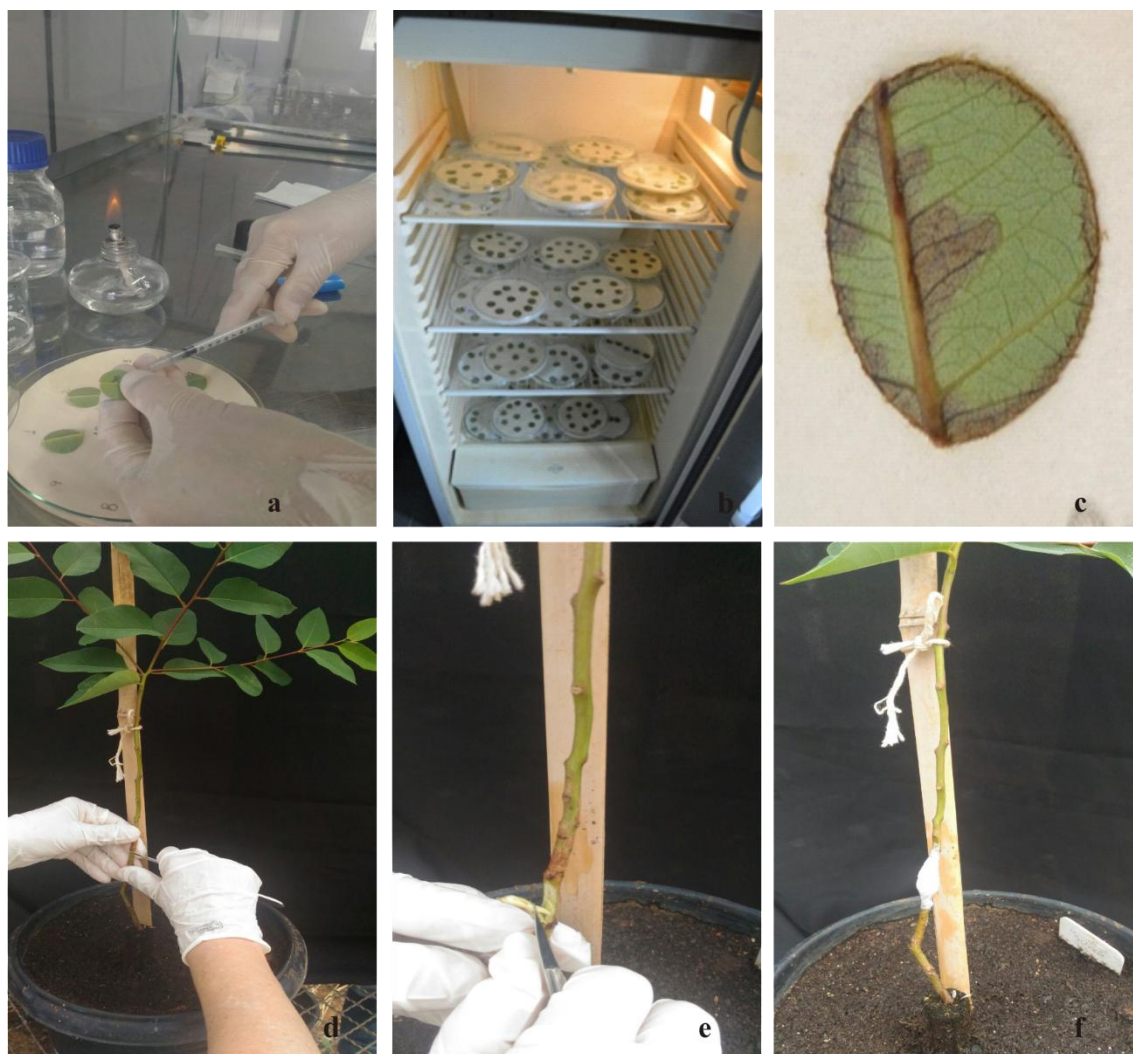


Figura 1. Montagem do experimento de avaliação da infecção por *Ceratocystis fimbriata* em discos foliares de híbridos de eucalipto (a – c). a) inoculação do disco foliar; b) disposição dos discos na placa e organização do experimento em BOD; c) detalhe do disco foliar do clone BA7346 mostrando invasão do fungo cinco dias após inoculação do fungo. d – f) inoculação de *Ceratocystis fimbriata* no caule.

As avaliações fenotípicas nos discos foliares infectados foram realizadas diariamente até o quinto dia após a inoculação, observando-se em estereoscópio o crescimento do micélio em cada disco. Foram observados os parâmetros: crescimento do micélio do fungo na área inoculada; crescimento do fungo fora da área inoculada; desenvolvimento de micélio hialino e presença de reação de hipersensibilidade (RH) no local da área inoculada. O número de

peritécio e de micélio hialino por disco foram quantificados diariamente e as médias calculadas por placa.

Os clones foram classificados quanto à resistência com base na distribuição de frequência obtidas pelas avaliações em: 1) Altamente Resistente (AR – 0), os clones que apresentaram micélio hialino com reação de hipersensibilidade, sem peritécio, ou não apresentaram desenvolvimento do fungo; 2) Resistente (R entre 0,1 – 2); 3) Moderadamente Resistente (MR entre 2,1 – 5) ; 4) Moderadamente Suscetível (MS entre 5,1 – 10); 5) Suscetível (S entre 10,1 – 15) e 6) Altamente Suscetível (AS maior que 15 cm). A frequência de cada uma das classes foi obtida por tratamento.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo teste F, em nível de 5% de probabilidade. Posteriormente, a comparação entre as médias foi realizada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) e plotado em Boxplot, com auxílio do programa R.

Uma das placas foi fotografada com uma câmera *Canyon*, durante os cinco dias de avaliação. Com auxílio do software Quant® (VALE et al., 2003) foram realizadas análises das imagens e estimados os valores de severidade em porcentagem de área lesionada.

Os valores médios de severidade da doença por dia para cada genótipo foram plotados em relação ao tempo e posteriormente calculada a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), a saber: $AACPD = \sum [((y_1 + y_2)/2) * (t_2 - t_1)]$, em que, y_1 e y_2 são duas avaliações consecutivas realizadas nos tempos (dias) t_1 e t_2 entre as avaliações da severidade, (SHANER e FINNEY, 1977).

Avaliação fenotípica no xilema

Para validar os resultados do experimento de inoculação em discos foliares, foi realizada a metodologia padrão de avaliação da resistência de clones de eucalipto por infecção no xilema. Plantas com seis meses foram inoculadas com um disco de meio de cultura MEAY (Ø5mm), colonizado com *Ceratocystis fimbriata*. O disco foi introduzido em um ferimento realizado com o auxílio de um bisturi, onde foi feito um corte superficial longitudinal de aproximadamente 2 cm no caule da planta a 10 cm acima do solo. No corte foi colocado algodão umedecido com água e protegido com plástico PVC. O controle foi inoculado com disco de meio de cultura MEAY esterilizado (FIRMINO et al., 2013, FIRMINO et al., 2012). As plantas inoculadas foram mantidas em casa-de-vegetação. Foi adotado o delineamento inteiramente casualizado, com 10 repetições (plantas) por clone inoculado. Três plantas controle de cada clone foram mantidas durante todo o experimento.

A avaliação da resistência foi realizada após 50 dias da inoculação. As plantas foram seccionadas no sentido longitudinal do caule para medir o comprimento da lesão (em cm) causada pelo crescimento do fungo no xilema. O caule foi seccionado do colo ao ápice da planta (MAGALHÃES et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2015, FIRMINO et al., 2013; MAFIA et al., 2011; ROSADO, 2009; ZAUZA et al., 2004; TUMURA et al., 2004; BAKER et al., 2003). Os clones foram classificados quanto a resistência, de acordo com o descrito por Mafia et al. (2011), baseado na frequência de distribuição do comprimento da lesão, pelo seguinte critério: Altamente Resistente (AR entre 0,1 - 3 cm); Resistente (R entre 3,1 - 6 cm); Moderadamente Resistente (MR entre 6,1 - 9 cm); Moderadamente suscetível (MS entre 9,1 - 12 cm); Suscetível (S entre 12 a 15 cm) e Altamente suscetível (AS acima de 15 cm).

Adicionalmente foram realizados cortes histológicos transversais do caule de cada clone, a 10 cm acima do solo, 50 dias após a inoculação, para obtenção de lâminas com solução de álcool 15 %. Essas lâminas foram analisados no Software Axio-visco 4.9.1, modelo da câmera AxioCamMR5 e contabilizados os números de vasos com o crescimento de micélio do fungo para posterior calculo da porcentagem de vasos infectados.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo teste F, em nível de 5% de probabilidade. Posteriormente, a comparação entre as médias foi realizada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) e plotado em Boxplot, com auxílio do programa R.

RESULTADOS

Avaliação fenotípica em discos foliares

Com base na metodologia de avaliação com discos foliares foi possível classificar os clones de *Eucalyptus* quanto à resistência a murcha-de-*Ceratocystis*. Nos clones suscetíveis foram observados peritécio, micélio e crescimento do fungo além da área da inoculação (Figura 2a). Como reação de resistência observou-se a presença de micélio hialino e reação de hipersensibilidade (Figura 2b).

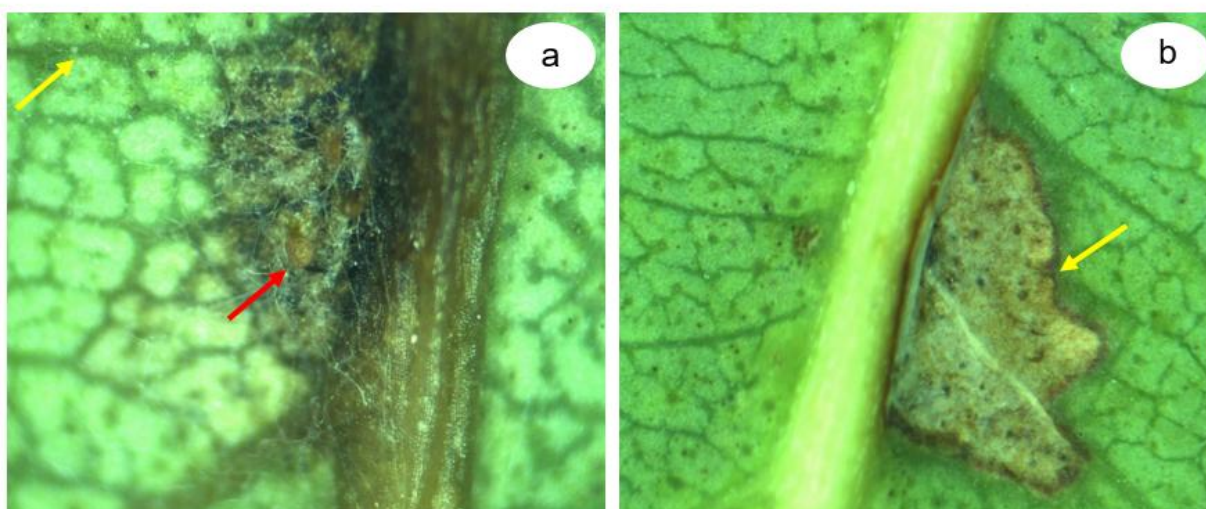
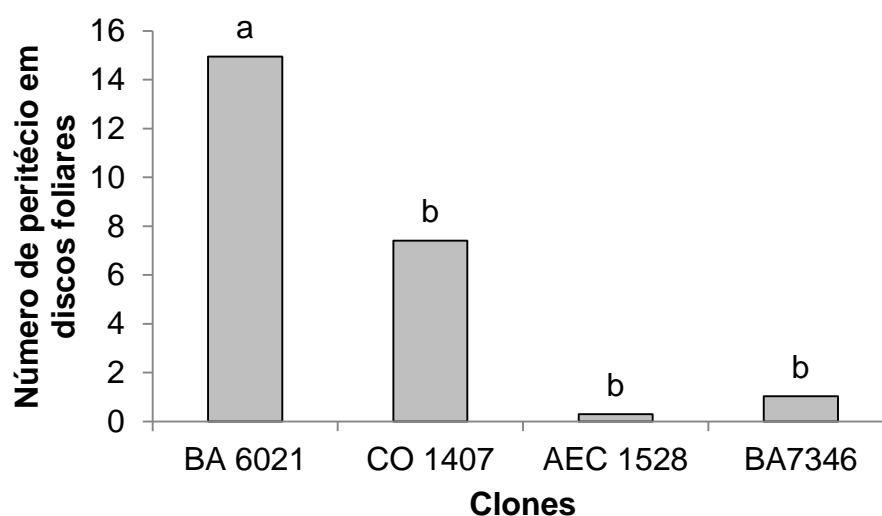


Figura 2. Sintomas observados no tecido de disco foliar de clones de eucalipto cinco dias após a inoculação de *Ceratocystis fimbriata*. a) Clone BA6021 suscetível, seta amarela crescimento do fungo além da área da inoculação e seta vermelha indicando presença de peritécio; b) Clone AEC 1528 resistente, seta amarela micélio hialino com reação de hipersensibilidade.

O clone BA 6021 apresentou maior número peritécios no quinto dia após a inoculação (Figura 3a). Os clones foram classificados quanto à resistência com base na frequência das plantas em seis classes previamente determinadas (Figura 3b). As plantas do clone AEC 1528 foram classificadas como altamente resistentes e resistentes; diferindo do BA 7346 categorizado como moderadamente resistente. O clone mais suscetível foi o BA 6021 (altamente suscetível, suscetível e moderadamente suscetível).



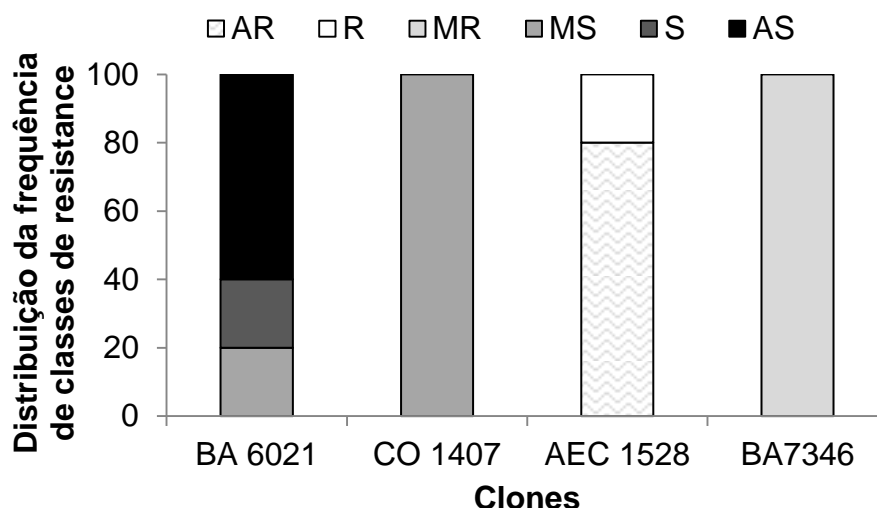


Figura 3. (a) Número médio de peritécios em discos foliares de clones de eucalipto, cinco dias após a inoculação com *Ceratocystis fimbriata*. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), CV= 98.02%. (b) Distribuição da frequência de classes de resistência (com base no número de peritécios) apresentada pelos clones de eucalipto cinco dias após inoculação, onde: AS – altamente suscetível, S - Suscetível; MS – Moderadamente Suscetível; MR – Moderadamente Resistente; R – Resistente; AR – Altamente Resistente.

A severidade do crescimento do micélio do fungo nos discos foliares foi estimada diariamente até o quinto dia após a inoculação (Figura 4). A severidade média da infecção nos discos variou de 5,68% (AEC 1528 – primeiro dia após a inoculação) a 90,81% (BA6021 – quinto dia após a inoculação). A partir do segundo dia verificou-se crescimento do micélio no local da inoculação para todos os clones. O clone AEC 1528 foi considerado resistente, pois apresentou micélio hialino com reação de hipersensibilidade (Figura 5). Os clones BA 6021, CO 1407 e BA 7346 apresentaram aumento significativo na quantidade de micélio na área da inoculação, com invasão da nervura central, penetração no tecido foliar e coloração marrom escura do tecido (Figura 5). O clone BA 6021 também apresentou crescimento de peritécio a partir do terceiro dia e, no quinto dia, o fungo alcançou a periferia do discos foliares deste clone e observou-se a formação de peritécio em toda a área avaliada (Figura 5).

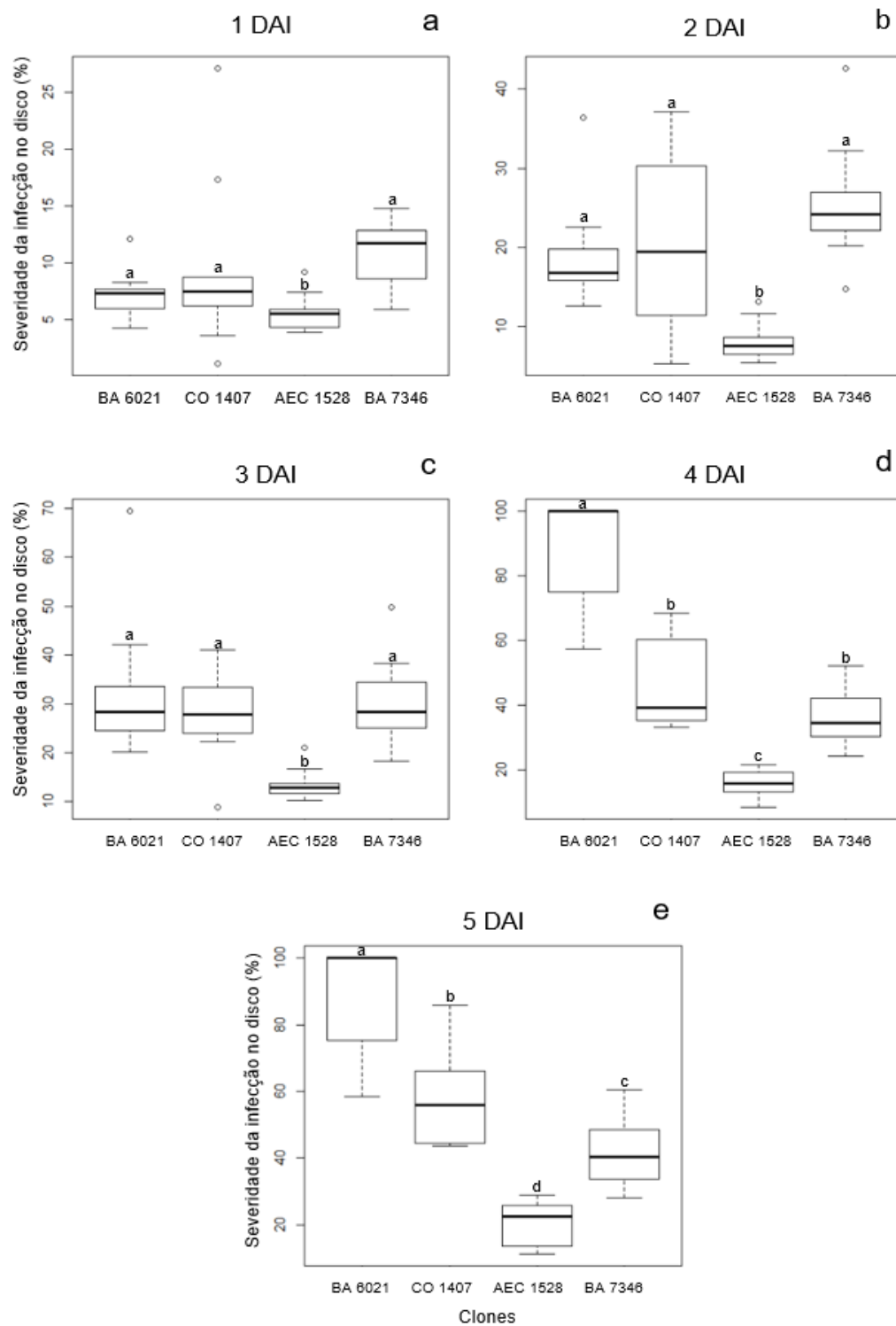


Figura 4: Severidade da infecção em discos foliares de clones de eucalipto infectados com *Ceratocystis fimbriata* durante cinco dias após inoculação (DAI) (CV = 24,38% no 5° DAI). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

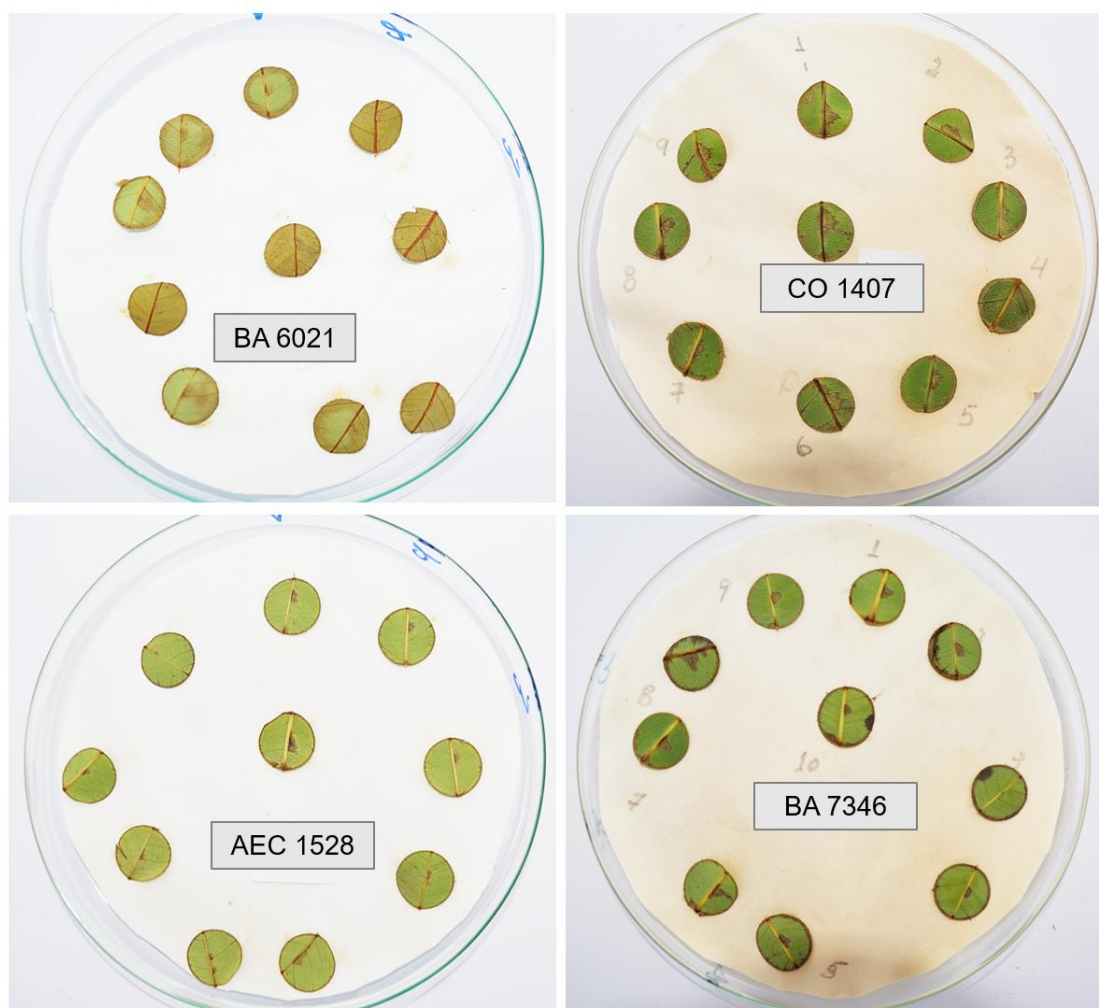


Figura 5. Discos foliares inoculados com *Ceratocystis fimbriata* cinco dias após a inoculação (DAI). a) Clone suscetível BA 6021; b) Discos foliares inoculados do clone suscetível; B) clone CO 1407; c) clone resistente AEC 1528; d) clone BA 7346.

O clone BA6021, apresentou maior severidade da infecção. No quarto dia, após a inoculação este clone apresentou-se com diferença significativa dos demais, sendo considerado o mais suscetível (Figura 4). Estes resultados foram coerentes com o resultado da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) calculada para os diferentes clones (Figura 6). Embora resistente, o clone AEC 1528 apresentou AACPD porque alguns discos apresentaram micélio hialino, que foram considerados pelo programa QUANT.

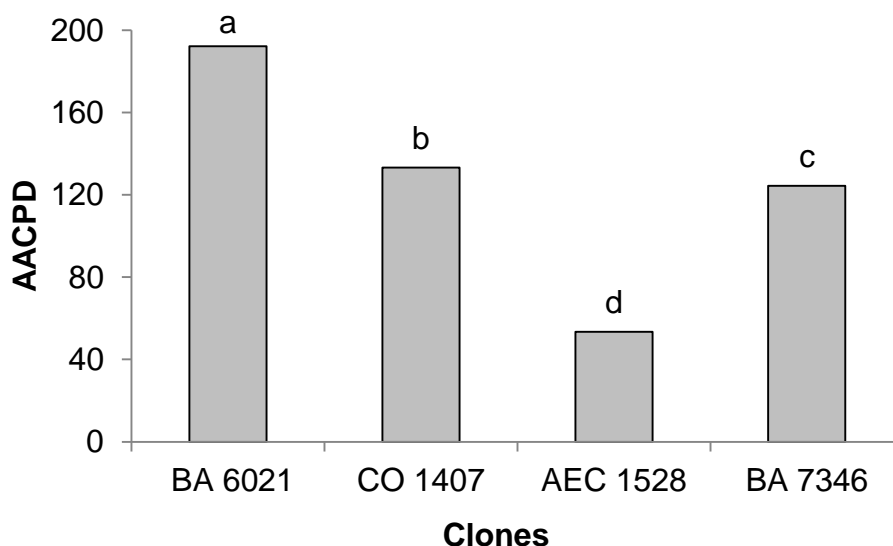


Figura 6. Área abaixo da curva de progresso da doença total (AACPD) calculada para diferentes clones de eucaliptos inoculados com *Ceratocystis fimbriata* (Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, $p < 0,05$).

Avaliação fenotípica no xilema

Na metodologia tradicional de avaliação pela inoculação no caule, os clones BA 6021, CO 1407, BA 7346 apresentaram escurecimento dos vasos do xilema (Figura 7). O clone BA 6021 também apresentou maior comprimento da lesão e maior severidade, sendo classificado como suscetível (Tabela 1). A severidade média da infecção variou de 4,86 a 13,83% entre os clones. Os clones CO 1407, AEC 1528 e BA 7346 tiveram suas médias estatisticamente iguais de severidade e comprimento da infecção. Entretanto, as plantas do clone AEC 1528 apresentaram o desenvolvimento do fungo restrito ao local da inoculação, confirmando a resistência também verificada na avaliação de discos foliares. Os clones CO 1407 e BA 7346 apresentaram crescimento do fungo fora da área lesionada.



Figura 7. Escurecimento do vaso do xilema de clones de eucalipto, 50 dias após inoculação com *Ceratocystis fimbriata*. Caule dos clones: a) BA 6021; b) CO 1407; c) AEC 1528 e d) BA 7346. Setas amarelas indicam local da inoculação e a seta vermelha evidencia a extensão do xilema infectado.

Como a estimativa da severidade da doença (comprimento das lesões) na metodologia tradicional é calculada considerando a altura da planta (Rosado et al., 2010) um clone que por características genéticas, cresce mais que outro, mesmo com a mesma extensão de lesão no xilema causada pelo fungo, irá apresentar menor severidade, o que pode comprometer a avaliação. Assim, a altura dos clones inoculados foi avaliada e constatou-se que o clone BA 7346 apresentou o menor crescimento (Tabela 1). Além disso, o comprimento da infecção no xilema apresenta uma grande variação amostral? Experimental (CV = 54,08%) (Tabela 1).

Tabela 1. Médias da severidade (%), comprimento da infecção no xilema (cm) e altura da planta (cm).

Clone	Severidade	CI	Altura
BA 6021	13,83 a	12,96 a	93,69 a
CO 1407	6,65 b	6,26 b	94,09 a
AEC 1528	4,86 b	4,57 b	94,01 a
BA 7346	6,07 b	5,09 b	83,91 b
CV (%)	54,35	54,08	9,71

Médias seguidas pela mesma letra (na coluna) não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A planta do clone BA 6021, apresentou murcha, mesmo sob condições de irrigação (Figura 7b). No corte longitudinal realizado no caule da planta, observou-se o escurecimento no vaso do xilema causado pela infecção do *C. fimbriata* (Figura 7a). Portanto, estresse hídrico em plantas doentes pode ocorrer como resultado do crescimento de hifas do patógeno e/ ou produção de esporo, sendo que a presença dessas estruturas no interior dos vasos impede o fluxo normal de água, provocando a murcha.



Figura 8. Sintoma de infecção por *Ceratocystis fimbriata* no clone BA 6021. a) Planta infectada com sintoma de murcha (a esquerda) e planta testemunha (a direita). B) secção longitudinal do caule de planta infectada a esquerda evidenciando o escurecimento do xilema causado pelo fungo, e planta não infectada à direita.

Quanto à severidade da infecção no caule clone BA 6021 teve maior infecção (Figura 8a). Entretanto, como este método apresenta grande variação entre as repetições de um mesmo tratamento, a análise e classificação das plantas quanto a resistência foi realizada com base na frequência, de acordo com Mafia et al. (2011).

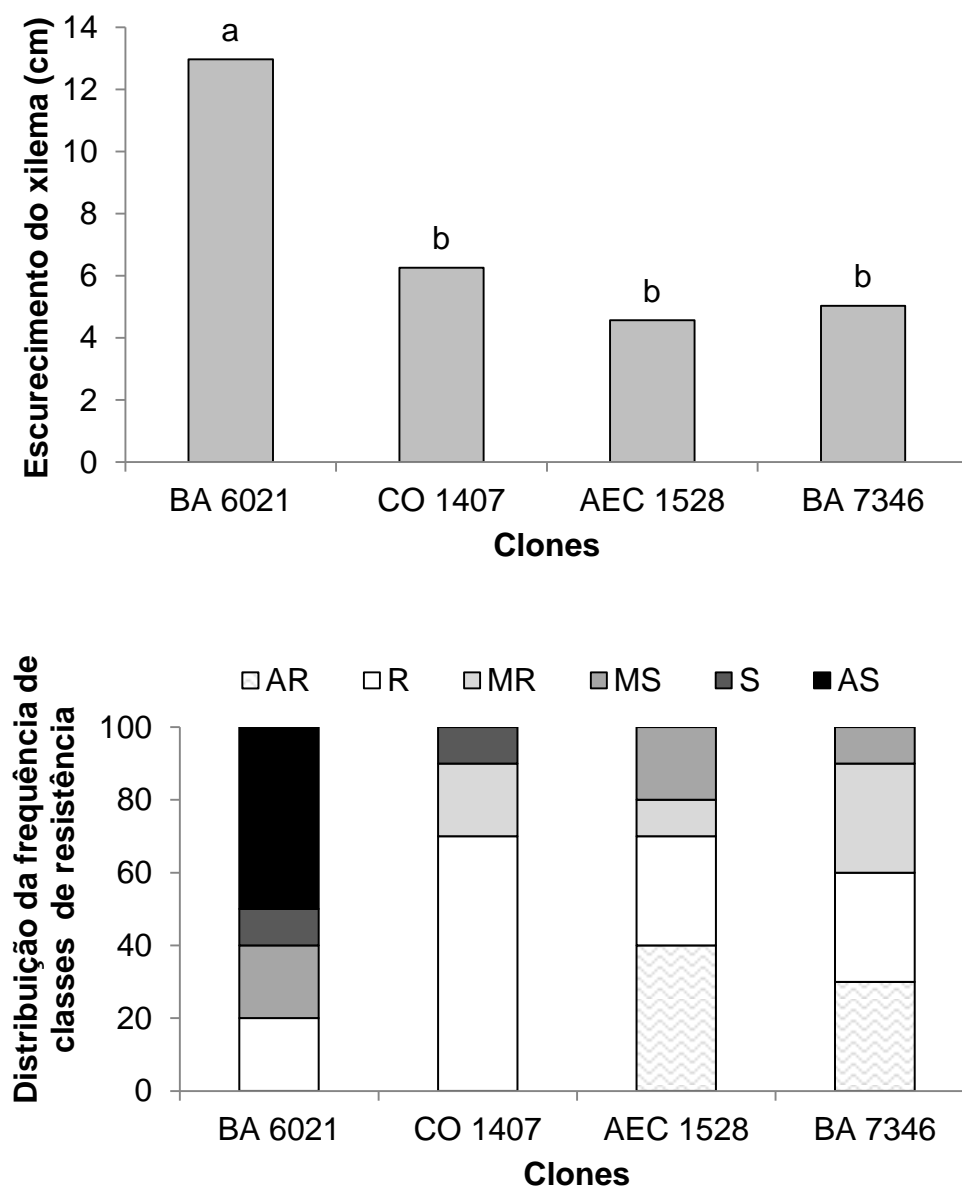


Figura 9. (a) Comprimento médio do escurecimento do xilema, causado pela infecção de *Ceratocystis fimbriata* nos clones de eucalipto. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), CV= 54,08%. (b) Distribuição das frequências de classes de resistência (com base no comprimento da lesão, de acordo com Mafia et al. (2011)) apresentada pelos clones de eucalipto 50 dias após a inoculação onde: AS – altamente suscetível, S - suscetível; MS – moderadamente suscetível; MR – moderadamente resistente; R – resistente; AR – altamente resistente.

Na análise comparativa entre os métodos de inoculação no caule e em discos foliares verificou-se correspondência dos resultados para o clone mais suscetível (BA

6021) e para o mais resistente (AEC 1528) (Figura 9 a, b). Entretanto a avaliação em discos foliares foi mais sensível na detecção de reação de suscetibilidade dos clones CO1407 e BA 7346, além da obtenção destes resultados com apenas cinco dias após inoculação e sem a necessidade de destruição da planta. Corroborando com estes resultados, a análise histológica do caule das plantas aos 50 dias após a inoculação, também indicou que o clone AEC 1528 (resistente) apresentou menor porcentagem de vasos infectados, enquanto os clones BA 6021 e CO 1407 apresentaram as maiores porcentagens (Figura 9 c).

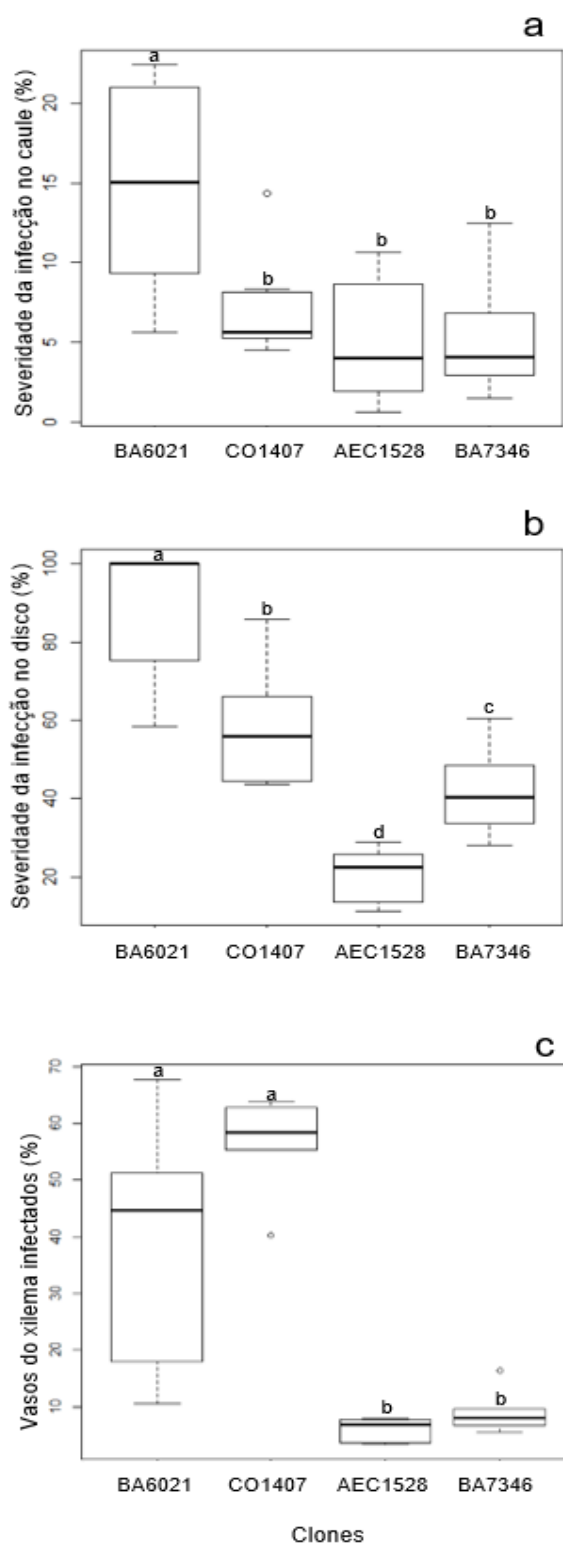


Figura 10. Avaliação da severidade da infecção de clones de Eucalipto por *C. fimbriata*, a) severidade da lesão no caule, aos 50 DAI; b) severidade da infecção do disco 5 DAI. c) Porcentagem de vasos do xilema infectado (%). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

Avaliação fenotípica em discos foliares

Na metodologia avaliada nesse estudo, utilizando inoculação de esporos nos tecidos de discos foliares, em três dias após inoculação foi possível distinguir genótipos resistentes de suscetíveis. O fungo inoculado diretamente no tecido foliar fica exposto aos nutrientes da planta e a reação do hospedeiro, o que pode levar a resposta mais rápida quanto a capacidade do genótipo em responder a infecção.

Além da metodologia em inoculação em disco não ser destrutiva para a avaliação da infecção por *Ceratocystis fimbriata* em eucalipto, também apresenta vantagem de utilizar uma planta por clone, bem como ser precoce, ou seja, poder ser realizada em mudas jovens. As metodologias de avaliação da infecção no caule, exige mudas com diâmetro de 1,5 cm, o que necessita de 60 a 120 dias, para a inoculação (MAGALHÃES et al., 2015; FIRMINO et al., 2013; TUMURA et al., 2012; MAFIA et al., 2011; ROSADO, 2009; ZAUZA et al., 2004; BAKER et al., 2003). Na metodologia dos discos foliares o tempo de resposta é mais rápido (a partir de 3 dias), comparado aos métodos de inoculação descritos na literatura (em média 50 dias), como na avaliação do comprimento da descoloração do xilema para determinação da resistência / suscetibilidade (FIRMINO et al., 2015; MAFIA et al., 2011; OLIVEIRA, et al., 2010; ZAUZA et al., 2004) e inoculação de alíquota de suspensão de fungo em folhas de hospedeiros (MAGALHÃES et al., 2015).

A classificação do clone BA 6021 como suscetível e do clone AEC 1528 como resistente obtidas com a metodologia dos discos foliares foram corroboradas também pelas análises de inoculação no xilema e anatômica. Entretanto os resultados para os clones CO 1407 e BA7346 divergiram nos diferentes métodos. Na metodologia de infecção no xilema o clone CO 1407 apresentou resistência moderada na maioria das plantas e o clone BA7346 um nível de resistência similar ao clone AEC 1528. Porém ao observar a análise anatômica o clone CO 1407 apresentou elevado número de vasos infectados, presença de peritécios e AACPD aumentada, evidenciando suscetibilidade moderada ao fungo. Da mesma forma o clone BA 7346 apresentou presença de peritécios e aumento da AACPD, contudo, estes apresentaram baixa porcentagem de vasos infectados, revelando resistência moderada. Nesse contexto a análise por meio da inoculação em discos apresentou-se mais sensível à detecção, em relação à metodologia de infecção no xilema.

Para o estudo de resistência em clones de eucalipto, o método utilizado tradicionalmente é a avaliação no xilema, o qual apresenta descoloração e escurecimento dos vasos nos quais há o desenvolvimento do micélio de *C. fimbriata*. Entretanto, são relatadas alterações na coloração do lenho em locais distantes das regiões infectadas pelo patógeno, o que pode, em alguns casos, resultar em superestimação da severidade da doença (MAFIA et al., 2011), o que também ocorreu para o clone CO 1407 neste estudo.

Os clones BA 6021, CO1407 e BA7346 embora tenham apresentado desenvolvimento do fungo no xilema, mantiveram-se morfológicamente assintomáticos durante 50 dias de avaliação, a exceção de uma planta do clone BA 6021, que apresentou murcha. Plantas assintomáticas foram relatadas em diferentes estudos de resistência conduzidos com *Ceratocystis* sp. em clones de eucalipto (TUMURA et al., 2012; ZAUZA et al., 2004; FIRMINO et al., 2013). A influência de fatores climáticos na expressão dessa doença, podem camuflar os sintomas de infecção no campo em épocas que exigem menor transpiração da planta, ou seja, épocas com temperaturas amenas e períodos de chuvas bem distribuídos.

A vantagem da metodologia proposta neste trabalho em relação à metodologia de Magalhães et al. (2015), que propuseram um método de detecção precoce de *Ceratocystis* spp em diversos hospedeiros, entre eles eucalipto, consiste em que, inoculando uma gota de suspensão do fungo sobre folhas do hospedeiro, é necessário a formação de peritécio para estimativa da resistência/ suscetibilidade; enquanto que ao inocular a suspensão do fungo diretamente no tecido foliar, os conídios germinam ao estarem em contato direto com nutrientes da célula da planta, espalhando-se rapidamente através do tecido foliar (D'AMBRA et al., 1977). Assim, na planta resistente, o avanço do fungo é impedido por genes de resistência, que ativam a produção de substâncias de resistência como as gomas ou géis. Além disso, na metodologia citada anteriormente, Magalhães et al. (2015), a infecção do fungo depende da permanência da gota de suspensão no local do corte da nervura. Logo, quando a gota escorre, o fungo não penetra. Isto foi observado no teste realizado, no qual a gota escorreu e como consequência o fungo desenvolveu-se muito fracamente na nervura central.

Mafia et al. (2011) estudando um protocolo rápido e simples para avaliação da resistência a murcha-de-*Ceratocystis*, observou que o tempo necessário para o crescimento das plantas em vasos e o grande consumo de espaço é desvantagem desta

técnica, bem o fato de se tratar de avaliação destrutiva das plantas. Ferreira et al. (2005) desenvolveram uma técnica rápida de avaliação por meio de microscopia óptica comum para a detecção de *Ceratocystis*, em caule infectado e, visualizando clamidósporo no xilema em cortes histológico do tecido infectado. Entretanto, tal técnica necessita de cortes nas hastes contaminadas do eucalipto. A técnica apresenta a desvantagem de impossibilitar a manipulação das estruturas do fungo num meio de cultura ou numa isca de cenoura, e também ser destrutiva. Assim, a não destruição das plantas pelo método de avaliação em discos foliares, tem relevância em estudos de melhoramento genético, em que a avaliação precoce e não destrutiva de genótipos permite a seleção e manutenção dos mesmos após a caracterização quanto a resistência.

Analisando-se a AACPD total, obtida por meio da metodologia de discos foliares, foi possível observar que o clone AEC 1528 continuou apresentando a menor AACPD com maior resistência e o clone BA 6021 a maior AACPD, resultados semelhantes à análise de severidade do xilema, confirmando a efetividade da metodologia de análise dos discos foliares, corroborando as reações de resistência e suscetibilidade desses clones. Segundo Machado et al. (2008), a variável AACPD por integrar toda a curva do progresso da doença, levando em consideração o início da epidemia e a magnitude do incremento da severidade ao longo do tempo, devem ser limitada a teste de avaliação de poucos genótipos, como o que foi realizado nesse estudo, usando somente quatro genótipos.

A severidade é um método que procura determinar a porcentagem da área de tecido doente (sintomas/ e ou sinais visíveis), por meio da medição direta da área afetada com medidores de área em computador, ou por meio de chaves descritivas, medição automática e sensores remotos. Apresenta como vantagens ser mais precisa, expressando o dano real causado pelos patógenos, caracteriza melhor o nível de resistência a um patógeno e expressa com maior fidelidade a intensidade da doença no campo e os danos causados (LIBRELON, 2015). Assim, de acordo com os resultado do presente estudo, foi possível verificar uma metodologia sensível e confiável de fitopatometria para a quantificação da doença murcha-de-*Ceratocystis* em eucalipto, com base na avaliação de severidade em discos foliares aos cinco dias após a inoculação com o fungo, capaz de identificar germoplasma resistente/ suscetível a *C. fimbriata* que, por ser precoce e não destrutiva, pode ser utilizada em estudos de melhoramento genético do eucalipto.

CONCLUSÃO

A metodologia de avaliação precoce de disco foliar pode ser empregada na avaliação de clones resistentes ou suscetíveis de eucalipto, utilizando plantas jovens e obtendo resultados cinco dias após a inoculação com fungo.

Por se tratar de uma metodologia não destrutiva, não há o risco de perda de germoplasma importante para programas de melhoramento genético do eucalipto visando materiais resistentes.

De forma similar entre as duas metodologias, o clone AEC1528 mostrou-se resistente e os clones CO 1407 e BA 6021 foram suscetíveis ao fungo *Ceratocystis fimbriata*, enquanto o clone BA 7346 apresentou resistência moderada ao fungo.

AGRADECIMENTOS:

À UFES e Professora Dra Maria A. Ferreira da UFLA, por ter cedido o isolado de *Ceratocystis fimbriata*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alfenas, A. C.; Zauza, E. A. V.; Mafia, R. G.; Assis, T. F. 2009: Clonagem e doenças do eucalipto. (2nd ed.). Editora UFV. Viçosa, Brasil.
- Araújo, J. C.; Carneiro, C. J. G.; Silva, J. F.; Gomide, J. L. 2007: Influência da madeira com fungo *Ceratocystis fimbriata* no processo de produção de celulose e qualidade da celulose. O Papel, São Paulo, 68, 95-105.
- Baker, G. J.; Herrington, T. C.; Kraus, U.; ALFENAS, A. C. 2003: Genetic variability And host specialization in the Latin American clade *Ceratocystis fimbriata*. Phytopathology, 93, 1274-1284.
- D' Ambra, V. 1977: Growth and behavior of *Ceratocystis fimbriata* in plane-tree tissues a scanning electron microscope study. European Journal of Forest Pathology, Hamburg, 7, 351-357.
- Fernandes, B. V.; Zanuncio, A. J. V.; Furtado, E. L.; Andrade, H. B. 2014: Damage and losses due to *Ceratocystis fimbriata* in *Eucalyptus* wood for charcoal production. Bioresources, 9, 5473-5479.
- Ferreira, M. A.; Harrington, T. C.; Alfenas, A. C.; Mizubuti, E.S. 2011: Movement of genotypes of *Ceratocystis fimbriata* within and among *Eucalyptus* plantation in Brasil. Phytopatology, 11,1005-1012.
- Ferreira, F. A.; Maffia, L. A.; Barreto, R. W.; Demuner, N. L.; Pigatto, S. 2006: Sintomatologia da murcha de *Ceratocystis fimbriata* em eucalipto. Revista Árvore, 30, 155-162.
- Ferreira, F. A.; Maffia, L. A., Ferreira, E. A., 2005: Rapid detection of *Ceratocystis fimbriata* in infected wood of eucalyptus, mango, and other woody host. Fitopatologia Brasileira, Brasília. 30, 543-545.
- Firmino, A. C.; Tanaka, F. A. O.; Silva, S. D. V. M.; Ito, M.F.; Furtado, E. L. 2015: Colonização do xilema de eucalipto por *Ceratocystis* spp isolado de diferentes hospedeiros. Summa Phytopathologica. Botucatu, 41, 138 - 146.
- Firmino, A. C; Junior, H. J. T.; Souza, I. C. G. D. E.; Furtado, E. L. 2013: Resistência de genótipos de Eucalipto a *Ceratocystis* sp. Scientia Forestalis, 41,165-173.

- Firmino, A. C.; Júnior, H. J. T.; Costa, P. N.; Furtado, E. L. 2012: *Ceratocystis fimbriata* causando seca em atemóia na região de Botucatu-SP. Summa Phytopathologica, Botucatu. 38, 171-171.
- Harrington, T. C.; Torphe, D. J.; Alfenas, A. C. 2011: Genetic variation and variation in aggressiveness to native and exotic hosts among Brazilian populations of *Ceratocystis fimbriata*. Phytopathology. 101, 555 – 566.
- Indústria Brasileira de Árvores (IBÁ). 2016: Desempenho das árvores plantadas. 4. 96.
- Laia, M. L.; Alfenas, A. C.; Harrington, T. C. 2000: Isolation, detection in soil, and inoculation of *Ceratocystis fimbriata*, causal agent of wilting, die-back and canker in *Eucalyptus* (Abstract). Fitopatologia Brasileira, 25, 384.
- Machado, P. S.; Ferreira, E. M.; Binoti, D. H. B.; Mafia, R. G.; Alfenas, A. C. 2008: Resistência interespecífica de *Eucalyptus* à murcha-de-ceratocystis, causada por *Ceratocystis fimbriata*. Tropical Plant Pathology, Brasília, DF, 33, 268.
- Mafia, R. G.; Alfenas A. C.; Ferreira, E. A.; Binot, D. H. B. 2011: Método de seleção e identificação de fontes de resistência à murcha do eucalipto causada por *Ceratocystis fimbriata*. Revista Árvore: Viçosa, v.35, n.4, p.817-824.
- Mafia, R. G.; Ferreira M. A.; Zauza E. A. V.; Silva J. F.; Colodette J. L.; Alfenas A. C. 2013: Impact of *Ceratocystis* wilt on eucalyptus tree growth and cellulose pulp yield. Forest Pathology, 1-7.
- Magalhães, D. M. A.; Luz, E. D. M. N.; Lopes, U. V.; Niella, A. R. R.; Damaceno, V. O. 2016: Leaf disc method for screening *Ceratocystis* wilt resistance in cacao. Tropical Plant Pathology. 41, 155–161.
- Magalhães, D. M. A.; Luz, E. D. M. N.; Lopes, U. V.; Silva, S. D. V. M.; Damaceno, V.O.; Niella, A. R. R.; 2015: A New method for early detection on *Ceratocystis* Spp on various hosts. Agrotópica, Ilhéus. 27, 209 – 214.
- Nyassé, S. Cilas, C., Herail, C., Blaha, G. 1995: Leaf inoculation as an early screening test for cocoa (*Theobroma cacao* L.) resistance to *Phytophthora* black pod disease. Crop Protection. 14, 657–663.
- Oliveira, L. S. S.; Guimarães, L. M. S.; Ferraira, M. A.; Nunes, A. S.; Pimenta, L. V.

- A., Alfenas, A. C. 2015: Aggressiveness, cultural characteristics and genetic variation of *Ceratocystis fimbriata* on *Eucalyptus* spp. *Forest. Pathology*, 45, 505–514.
- Rosado, C. C. G; Guimarães, L. M. S.; Faria, D. A.; Resende, M. D. V.; Cruz, C. D.; Grattapaglia, D.; Alfenas, A. C. 2016: QTL mapping for resistance to *Ceratocystis* wilt in *Eucalyptus*. *Tree Genetics & Genomes*. 12, 62-72.
- Rosado, C. C. G; Guimarães, L. M. S.; Titon, M.; Alfenas, A. C. 2010: Resistance to *Ceratocystis* Wilt (*Ceratocystis fimbriata*) in Parents and Progenies of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. *Silvae Genetica*, 59, 99–106.
- Rosado, C.C.G. Genética da resistência à murcha-de-*Ceratocystis* (*Ceratocystis fimbriata*) em *Eucalyptus*.spp. 2009. Dissertação (Mestre em Ciências Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa. Viçosa. 2009.
- Shaner, G.; Finey, R. F. 1977: The effects of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in knox wheat. *Phytopathology*. 67, 1051-1056.
- Tumura, K. G.; Piere. C. D.; Furtado, E. L. 2012: Murcha por *Ceratocystis* em eucalipto: avaliação de resistência e análise epidemiológica. *Summa Phytopathologica*, 38, 54-60.
- Vale, F. X. R.; Fernandes Filho, E. I.; Liberato, J. R. 2003: Quant: a software for plant disease severity assessment. In: 8th International Congress of Plant Pathology. Christchurch New Zealand: University Christchurch, 105.
- Viera, P. M. Identificação de marcadores de genes de resistência a patógenos em eucalipto e soja por RGA. 2015. Dissertação (Mestre em Genética e Melhoramento) Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória. 2015.
- Van Wyk, M.; Wingfield, B.D.; Wingfield, M.J. 2011: Four new *Ceratocystis* spp. associated with wounds on *Eucalyptus*, *Schizolobium* and *Terminalia* trees in Ecuador., *Fungal Diversity Dordrecht*, 46, 111-131
- Zauza, E. A. V.; Alfenas, A. C.; Harrington, T. C.; Mizubuti, E. S.; Silva, J. F. 2004: Resistance of *Eucalyptus* clones to *Ceratocystis fimbriata*. *Plant Disease*, Saint Paul, 88, 758-760.

CAPÍTULO 2.

Estudo morfofisiológico e anatômico da infecção de *Ceratocystis fimbriata* em *Eucalyptus*

Morphophysiological-anatomical study in the infection *Ceratocystis fimbriata* in *Eucalyptus*

Regina Gonçalves dos Santos Oliveira¹, Liana Hilda Golin Mengarda¹, Willian Bucker Moraes², Adésio Ferreira^{1,2}, Marcia Flores da Silva Ferreira^{1,3*}

Universidade Federal do Espírito Santo, ¹Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Centro de Ciências Agrárias e Engenharia, ²Departamento de Agronomia, CCAE, UFES - Alegre, Espírito Santo, Brasil, ³Departamento de Biologia.
E-mail: marcia.ferreira@ufes.br (autor para correspondência).

Artigo a ser enviado para revista Forest Pathology

RESUMO

A cultura do eucalipto é uma das mais importantes do Brasil, constituindo-se em fonte de energia e madeira renovável, além de celulose e carvão. O eucalipto é infectado por diversos patógenos, principalmente fungos, desde o viveiro até plantios adultos. Este trabalho teve como objetivo realizar estudos morfofisiológicos da planta e anatômica do caule, em relação ao desenvolvimento de *C. fimbriata* no tecido do xilema em clones comerciais de *Eucalyptus*. Foram utilizadas mudas dos clones AEC 1528, BA 7346, CO 1407 e BA 6021, com seis meses de idade. Para a avaliação fenotípica do caule foi feita a inoculação do fungo no caule dos clones, com disco (Ø5mm) de meio de cultura MEAY, colonizado pelo fungo em 10 plantas por genótipo. Para este método, após inoculação a severidade da doença das plantas em função do tempo, foi avaliada 50 dias após a inoculação no xilema, utilizando escala de frequência. As características de desenvolvimento da planta, altura da parte aérea, diâmetro do caule, matéria seca das folhas e do caule foram avaliadas semanalmente até 50 dias após inoculação, calculou-se o crescimento médio acumulado desses parâmetros para cada clone. As variáveis de trocas gasosas, fotossíntese líquida (A), condutância estomática (g_s), transpiração (E) e razão entre a concentração interna e ambiente de CO_2 (C_i/C_a) foram avaliadas. Para as análises anatômicas do caule foram feitos cortes transversais, no ponto da inoculação, três centímetros antes e três centímetros depois do ponto de inoculação para detecção de estruturas de resistência ao patógeno. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e avaliados pelo teste F, em nível de 5% de probabilidade. A comparação entre as médias foi realizada pelo teste de Tukey. Os clones BA 6021, CO 1407, AEC 1528 e BA 7346 apresentaram plantas altamente suscetíveis a plantas altamente resistente, mostrando a variabilidades desses clones e grau de agressividade do fungo. No clone BA 6021 ocorreu redução do crescimento médio acumulado do caule, do diâmetro e murcha em planta. Mecanismos de resistência estrutural (lignina e géis) puderam ser observados nos cortes anatômicos após 50 dias da infecção do fungo. Nos parâmetros fisiológicos a infecção do fungo não interferiu no desenvolvimento dos clones. Com base nos resultados encontrados os clones AEC 1528 e BA 7346 mostraram-se resistente ao fungo *C. fimbriata* e o clone BA 6021 apresentou a maioria de suas plantas suscetíveis.

Palavras chaves: murcha-de-*Ceratocystis*, xilema, gel, resistência genética, eucalipto

ABSTRAT

The eucalyptus crop is one of the most important in Brazil, constituting a source of renewable energy and wood, besides supporting important processes for the production of pulp and coal. Eucalyptus, like other plant species, is infected by several pathogens, especially fungus, from the nursery to adult trees. In this work, was studies morphophysiological anatomy analyses in stem to observed the development of *C. fimbriata* in the xylem. It're using: AEC 1528, BA 7346, CO 1407, BA 6021 genotyps,(6-months-age). The phenotypic evaluations was carried out on the stem, it inoculated by fungus, it used of disc (Ø5mm) MEAY medium, colonized by the fungus in 10 plants per clone. For this method, the severity of the plant disease as a function of time was evaluated, after 50 days in the inoculation in the xylem, using frequency scale. The morphologycals characteristics, height of plant, stem diameter, dry matter leaf and stem were evaluated weekly up to 50 days after inoculation. The cumulative mean growth of these parameters was set for each clone. The variables of gas exchange, liquid photosynthesis (A), stomatal conductance (g_s), transpiration (E) and ratio between internal concentration and CO_2 (C_i/C_a) were evaluated. It're made cross-sections were made in the point of inoculation, 3 cm before and after the inoculation point, to observe resistance structures. The data was performed using analysis of variance and Tukey's test. The BA 6021, CO 1407, AEC 1528 and BA 7346 clones showed highly resistant plants, showing the variability of these clones and the degree of aggressiveness of the fungus. In the BA 6021 clone there was reduction of the average accumulated growth of the stem, diameter and wilt in the plant. Structural mechanism of resistance (lignin and gels) could be observed in the anatomical cuts of stem after 50 days of fungus infection. In the physiological parameters of fungus infection did not interfere in the development of the clones. Based on the results found AEC 1528 and BA 7346 clones were resistant to fungus *C. fimbriata* and BA 6021 clone presented most of their susceptible plants.

Keywords: *Ceratocystis* wilt, xylem, gel, genetic resistance, eucaliptus

INTRODUÇÃO

O Brasil é o líder mundial em áreas plantadas e em produtividade de eucalipto (IBA, 2016). Espécies do gênero *Eucalyptus* possuem vantagens como o rápido crescimento, alta capacidade de rebrota após a colheita, grande incremento de matéria seca, alta capacidade de produção de celulose, cobertura de solo para áreas inclinadas, produção de óleos essenciais e ainda um eficiente modo de propagação clonal (SINF, 2016) e amplamente utilizadas na indústria de papel, celulose, madeira, carvão e produção de óleos essenciais. Dentre as espécies mais plantadas no Brasil estão *E. grandis*, *E. camaldulensis*, *E. saligna* e *E. urophylla*, além de híbridos oriundos do cruzamento entre *E. grandis* e *E. urophylla* (MYBURG et al., 2014, FIRMINO et al., 2013; TUMURA et al., 2012; ZAUZA et al., 2004). Entretanto, um fator limitante à produtividade é a suscetibilidade a diversos patógenos, sendo notória a prevalência de fungos como agentes patogênicos (FIRMINO et al., 2013; TUMURA et al., 2012; ZAUZA et al., 2004).

O fungo *Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halsted, causador de murchas e cancrios, constitui um desafio à cultura do eucalipto, pelos danos e prejuízos causados e falta de controle químico (ROSADO et al., 2016; TUMURA et al., 2012; SANTOS, 2004). A murcha-de-ceratocystis é uma doença sistêmica, que infecta os tecidos vasculares, principalmente o xilema, ocasionando descoloração do lenho. A colonização dos vasos do xilema pelo *Ceratocystis* impede o fluxo normal da seiva bruta, levando à murcha e posterior morte da planta (ROSADO et al., 2016; FIRMINO et al., 2013; TUMURA et al., 2012). Cortes perpendiculares ao eixo principal de árvores infectadas evidenciam a descoloração radial, sintoma típico da doença (ALFENAS et al., 2009).

O plantio de genótipos resistentes é a forma mais eficiente de controle de *C. fimbriata* em eucalipto (ZAUZA et al., 2004). A herança genética da resistência é pouco conhecida, entretanto a identificação de genótipos de *Eucalyptus* spp. resistentes tem sido o objetivo de vários estudos de avaliação de parentais e progênes de eucalipto (ROSADO et al., 2016; 2010), visando uma forma efetiva de manejo e a identificação de diferentes fontes de resistência ao patógeno para uso no melhoramento genético.

As plantas se defendem do ataque de patógenos por mecanismos de resistência. Estes mecanismos podem ser de natureza estrutural e/ou bioquímica e podem ser formados antes (pré-formada/constitutiva) ou após a infecção (pós-formada/induzida). Os fatores estruturais agem como uma barreira física, impedindo a penetração do

patógeno e a colonização dos tecidos da planta, enquanto que os fatores bioquímicos são substâncias produzidas pelo hospedeiro, que se mostram tóxicas ou criam condições adversas para o crescimento do patógeno no interior da planta (PASCHOLATI e LEITE, 1995). Substâncias formadas nesses mecanismos, gomas ou géis, podem ser observados através de preparações anatômicas do material vegetal com cortes histológicos, o qual contribui para o entendimento do desenvolvimento do fungo nos vasos do xilema e suas possíveis alterações no hospedeiro. Também o desenvolvimento do micélio do patógeno de clones suscetíveis e a deformação dos vasos do xilema causada por *C. fimbriata* podem ser observados nesses cortes (SUN et al., 2008; TUMURA, 2011; FIRMINO et al., 2015; VIEIRA, 2015).

Em estudo prévio, Vieira (2015) relatou diferenças anatômicas nas raízes de híbridos de *E. grandis* x *E. urophylla* e clones de *E. urophylla* relatados com resistência ou suscetibilidade ao *C. fimbriata*, em plantas inoculadas. Estudos anatômicos com plantas inoculadas no caule com o fungo foram realizados por Firmino et al. (2015), relatando o início da infecção. Comparações anatômicas entre plantas inoculadas e não inoculadas em estágio avançado da infecção ainda não foram reportados. Neste estudo objetivou-se o estudo morfofisiológico da planta e anatômica do caule, em relação ao desenvolvimento de *C. fimbriata* no tecido condutor em híbridos comerciais de *Eucalyptus*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e inóculo

Os experimentos foram realizados no Setor de Fitopatologia-NUDEMAFI/DAG/ CCAE e Laboratório de Anatomia da Madeira/DCFM- Universidade Federal do Espírito Santo em agosto/ 2016. Os clones de eucalipto utilizados foram BA 6021, CO 1407, BA 7346 e AEC 1528, todos híbridos de *E. grandis* x *E. urophylla*. As mudas, com 90 dias foram adquiridas dos viveiros das empresas Ducampo de Linhares-ES e Pro Mudas Sul Minas Ltda/ Lavras-MG e transplantadas para vasos de 10 L com mistura de terra, areia e substrato comercial orgânico Bioplant (3:1:1), adubadas 30 e 60 dias após plantio, até seis meses de idade.

O isolado de *Ceratocystis fimbriata* utilizado foi cedido pela Prof. Dr^a Maria Alves Ferreira, proveniente do Banco de fungos do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras-MG. Para o isolamento do fungo foi utilizado meio de

cultura MYEA (2% de extrato de malte, 0,2 % de extrato de levedura e 2% de ágar) em placas de Petri. As placas foram acondicionadas em sala climatizada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, com 24 horas de luz até total preenchimento da placa.

Para a inoculação do isolado nas plantas foi utilizado um disco de meio de meio de cultura MEAY, colonizado pelo fungo ($\varnothing 5\text{mm}$). O disco foi introduzido em um ferimento realizado com o auxílio de um bisturi, onde foi feito um corte superficial longitudinal de aproximadamente dois cm no caule da planta 10 cm acima do solo. No corte foi colocado algodão umedecido com água e protegido com plástico PVC. O controle foi inoculado com disco de meio de cultura MEAY esterilizado (FIRMINO et al., 2012; FIRMINO et al., 2011).

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com 10 plantas (repetições) inoculadas e três plantas não inoculadas (testemunha) por clone. Cada planta com seis meses de idade. As plantas inoculadas e não inoculadas foram mantidas em casa-de-vegetação, por 50 dias até a avaliação fisiológica, morfológica e anatômica.

Análises morfológicas

As características de desenvolvimento da planta, altura da parte aérea e diâmetro do caule foram avaliadas no dia da inoculação e semanalmente até os 50 dias. O diâmetro do caule foi medido a 10 cm a partir da superfície do solo, utilizando paquímetro digital. A altura das mudas foram medidas com o auxílio de uma fita métrica graduada, medindo-se da base ao ápice das mudas. Ao final foi calculado o crescimento médio acumulado do caule em altura e diâmetro para cada clone.

Aos 50 dias após a inoculação as plantas foram separadas nas frações folhas, caule. Para estimar a matéria seca das folhas (MSF) e a matéria seca do caule (MSC), folhas e caule foram mantidos em estufa de circulação forçada a 65°C por 72 horas. Após esse período foram pesados em balança analítica para obtenção da massa seca da parte aérea.

Adicionalmente, aos 50 dias após inoculação foram realizadas as medições dos parâmetros fisiológicos, em três plantas (repetições) controle (com ferimento sem inoculação - CF), inoculadas com discos sem fungo e três plantas inoculadas com fungo (I). Foram medidas a fotossíntese líquida ((A), $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$), a condutância estomática ((g_s), $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$), a taxa de transpiração ((E) $\mu\text{mmol de H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Também foi obtida a relação entre a concentração interna e do ambiente de CO_2

(C_i/C_a) ($\mu\text{mol de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) pela utilização do Analisador de gases infravermelho (IRGA) modelo: modelo LI-6400, marca LICOR) as 10:00 h. Para essas análises foram escolhidas folhas localizada no terço médio da planta.

Análises anatômicas de caule

As análises anatômicas do caule foram realizadas antes da inoculação e 50 dias após a inoculação em duas plantas inoculadas e uma planta não inoculadas dos quatro clones em estudo. Foram feitos cortes histológicos transversais, a 10 cm acima do solo (local da inoculação do fungo) antes da inoculação de *C. fimbriata* por clone. Aos 50 dias após a inoculação, foram feitos cortes histológicos em três pontos do caule inoculado: (1) três cm acima da lesão, (2) no ponto da lesão e (3) três cm abaixo da lesão para verificar o crescimento fúngico nos vasos do xilema. Foram feitas lâminas com solução de álcool 15% e analisados no Software Axio-visco 4.9.1, modelo da câmera AxioCamMR5. A porcentagem de vasos de xilema infectados por *C. fimbriata* foi obtida considerando todos os três cortes de cada clone. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e avaliados pelo teste F, em nível de 5% de probabilidade. Posteriormente, a comparação entre as médias foi realizada pelo teste de Dunnet (5% de significância), com auxílio do programa R e plotado em Boxplot.

RESULTADOS

Análises morfológicas

Os valores médios de matéria seca de folhas e caules, altura das plantas, e diâmetro do caule dos clones infectados e não infectados com *C. fimbriata* estão apresentados na Tabela 1. Não houve diferença para as variáveis matéria seca da folha e do caule entre os clones inoculados e não inoculados, portanto a infecção do fungo não interferiu no desenvolvimento de folhas e do caule dos clones testados.

Tabela 1. Características morfológicas de clones de *Eucalyptus* inoculados (I) e não inoculados (IN) com *Ceratocystis fimbriata*, 50 dias após a inoculação. Matéria seca da folha (MSF), matéria seca do caule (MSC), altura da planta e diâmetro do caule.

Clone Inoculado	MSF	MSC	Altura	Diâmetro
BA6021	13,98 abcd	19,41 ac	89,9	137,67
CO1407	13,81 abcd	13,52 acd	74,5	89,89
AEC1528	15,06 ac	17,53 abcd	98,22	144,90
BA7346	10,23 abd	11,25 abd	88,25	83,37
Testemunhas				
BA6021	13,00 a	15,60 a	95,66	141,67
CO1407	9,30 b	11,14 b	79,33	90,67
AEC1528	16,22 c	18,39 c	93,67	105,67
BA7346	9,05 d	11,74 d	98,33	80,00

Médias seguidas por mesmas letras minúsculas na coluna não diferem entre si pelo Teste de Dunnet ($p < 0,05$). Ausência de letras sem diferença significativa.

O clone BA 6021 apresentou redução da média acumulada da altura e do diâmetro do caule em plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas. Os clones AEC 1528 e BA 7346 apresentaram um comportamento contrário, no qual houve ligeiro aumento em média de altura e diâmetro em plantas inoculadas.

As análises de crescimento das plantas em altura e diâmetro do caule foram realizadas semanalmente durante os 50 dias de experimento, sendo avaliadas as plantas inoculadas e controle. Considerando os crescimentos médios acumulados, os clones com maior número de plantas resistentes ao *C. fimbriata*, AEC 1528 e BA 7346, apresentaram maior incremento no diâmetro do caule em plantas inoculadas (Figura 2). Quanto ao crescimento em altura, o clone BA 7346 apresentou maior incremento no crescimento nas plantas inoculadas, de forma similar ao clone CO 1407. O clone com maior suscetibilidade ao fungo BA 6021 apresentou menor crescimento das plantas inoculadas em relação ao controle com diferenças a partir da primeira semana após a inoculação, sem alterações perceptíveis no diâmetro do caule. Alterações no diâmetro do caule e crescimento da planta ficaram evidentes a partir do sétimo dia na maioria dos casos, evidenciando a rapidez na resposta da planta à infecção do patógeno, tanto em plantas suscetíveis como em resistentes.

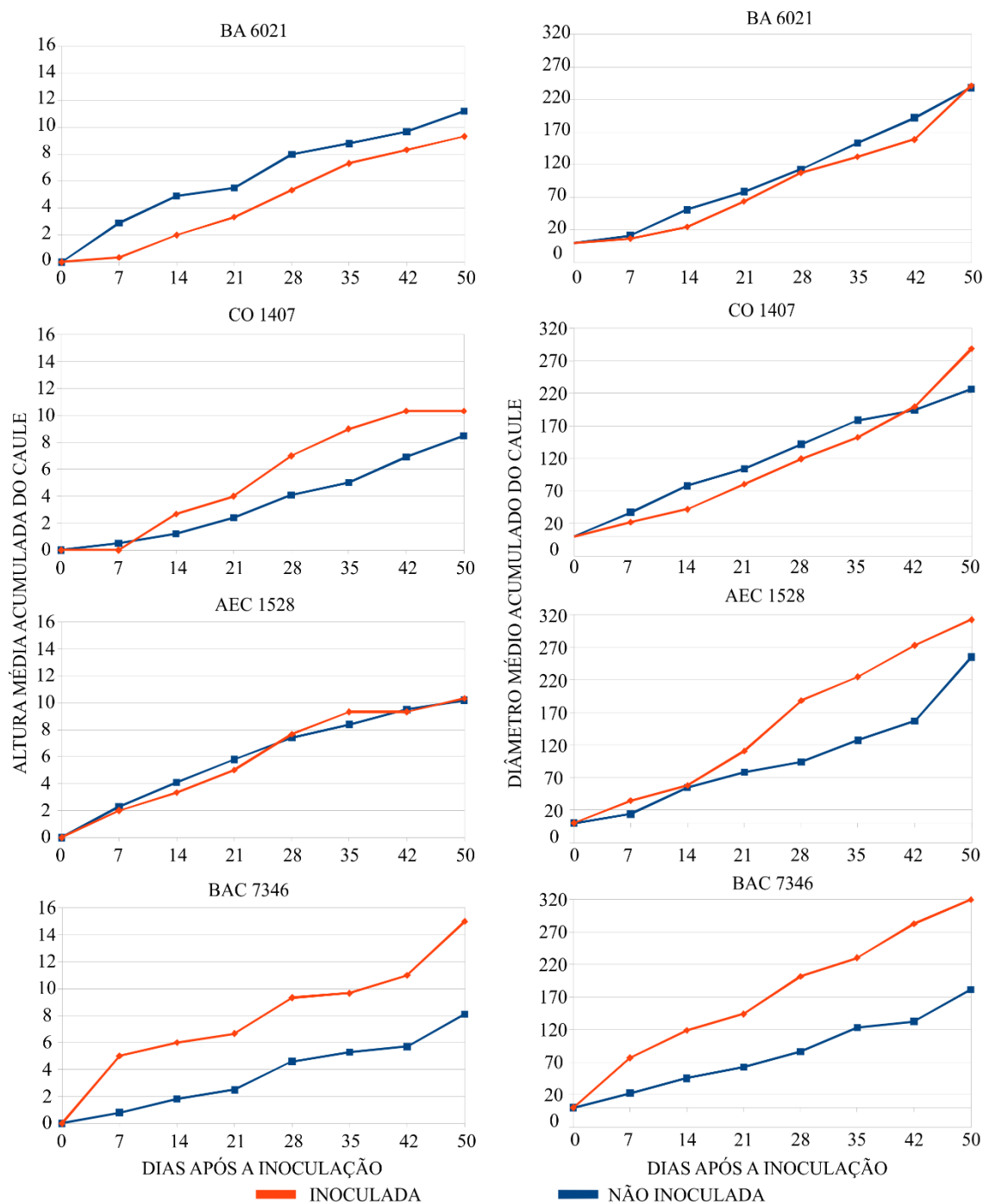


Figura 1. Crescimento médio acumulado do caule em altura (cm) e diâmetro (mm) para quatro clones de eucalipto em plantas não inoculadas (azul) e inoculadas (laranja) aos 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42 e 50 dias após a inoculação.

Análises fisiológicas

Em geral, de acordo com as análises da fotossíntese (A), condutância estomática (g_s), transpiração (E) e concentração de CO_2 intercelular e concentração de CO_2 no

ambiente (C_i/C_a), 50 dias após inoculação, a infecção por *C. fimbriata* não influenciaram no desenvolvimento dos clones de eucalipto para os clones BA 6021, CO 1407, BA 7346. O clone AEC 1528 apresentou maior fotossíntese, transpiração e condutância estomática nas plantas não inoculadas (Tabela 2). Os clones CO 1407 e BA 7346 apresentaram os maiores valores relativos aos parâmetros fisiológicos e o BA 6021 os menores.

Tabela 2. Médias das variáveis fisiológicas em clones de eucalipto infectados (I) e não infectados (NI) por *Ceratocystis fimbriata*: fotossíntese líquida ((A) $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$), condutância estomática (g_s), $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$), taxa de transpiração ((E) $\mu\text{mmol de H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e concentração intercelular de CO_2 e concentração ambiente de CO_2 (C_i/C_a) ($\mu\text{mmol de H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) aos 50 dias após infecção.

Genótipo	A		G_s		E		C_i/C_a	
	I ¹	NI ²	I	NI	I	NI	I	NI
BA6021	5,78	5,34	0,06	0,06	0,002	0,002	0,57	0,56
CO1407	9,22	9,87	0,15	0,13	0,006	0,003	0,66	0,63
AEC1528	4,82	8,73*	0,04	0,11*	0,002	0,004*	0,42	0,62
BA 7346	9,09	9,83	0,14	0,15	0,004	0,004	0,67	0,66
Média	7,22	8,44	0,09	0,11	0,004	0,003	0,58	0,62
CV%	33,79		28,07		26,05		11,89	

Médias com asterisco na linha diferem entre si pelo teste F ($p < 0,05$). Ausência de asterisco sem diferença significativa. I¹ = médias das plantas inoculadas; NI² = médias das plantas não inoculadas; ¹média das plantas inoculadas e não inoculadas.

Análises anatômicas

Nos cortes transversais dos clones inoculados, evidenciou-se o crescimento do micélio de *C. fimbriata* no xilema causando alterações nas paredes dos vasos, o que não foi observado nos controles, os quais mostram os vasos íntegros, ovalados, claros e paredes finas (Figuras 2, 3, 4 e 5). Vasos do xilema intactos foram observados nas plantas controles do clone BA 6021 tanto nos cortes antes da data da inoculação, quanto nos cortes de 50 dias após inoculação (Figuras 2a e 2b). Nestes cortes observou-se lignina pelo crescimento natural da planta, apresentando xilema e medula normal. Contudo, neste mesmo clone em plantas inoculadas (Figura 2c) as respostas a infecção foram crescimento do micélio de *C. fimbriata* nos vasos de xilema, a presença de tecido necrosado e a região do câmbio formando novos tecidos próximo a área necrosada pelo fungo. Na Figura 2d, é possível observar as hifas do fungo ocupando o vaso do xilema e o acúmulo de goma no vaso.

Também, nos cortes transversais nas plantas controles do clone CO 1407 (Figura 3a a 3d) foi possível observar vasos do xilema intactos (Figura 3a) e após 50 dias da inoculação (Figura 3b) lignina pelo crescimento natural da planta e vaso do xilema com goma. A planta normalmente produz substâncias de proteção em tecidos saudáveis, e quando infectada com micro-organismos a quantidade dessas substâncias são intensificadas. Neste mesmo clone infectado por *C. fimbriata*, após 50 dias observou-se, tecido necrosado e vasos do xilema com crescimento do micélio de *C. fimbriata* (Figura 3c). O fungo cresceu radialmente no tecido do xilema (Figura 3d) e observou-se o crescimento do micélio nos vasos.

No clone AEC 1528, após 50 dias de infecção verificou-se tecido necrosado e vasos do xilema com crescimento de micélio do fungo (Figura 4c). A planta desenvolveu estratégia de defesa, como o crescimento de tecido parenquimático para impedir o crescimento do patógeno, como pode ser visto na Figura 4d: o crescimento de tecidos novos próximo a área necrosada evidencia um mecanismo de defesa da planta à infecção de *C. fimbriata*, desviando-se da área infectada.

Os cortes transversais do clone BA 7346 Figuras 5a a 5d, nos 50 dias após inoculação, vasos do xilema com crescimento do micélio do fungo foram observados (Figura 5c). Na Figura 5d, também, observou-se um crescimento de tecidos novos desviando do tecido de cicatrização.

Na análise da contagem do xilema dos clones estudados, os clones CO 1407 e BA 6021 apresentaram maior porcentagem de vasos do xilema infectado não diferenciando entre si estatisticamente (Figura 6).

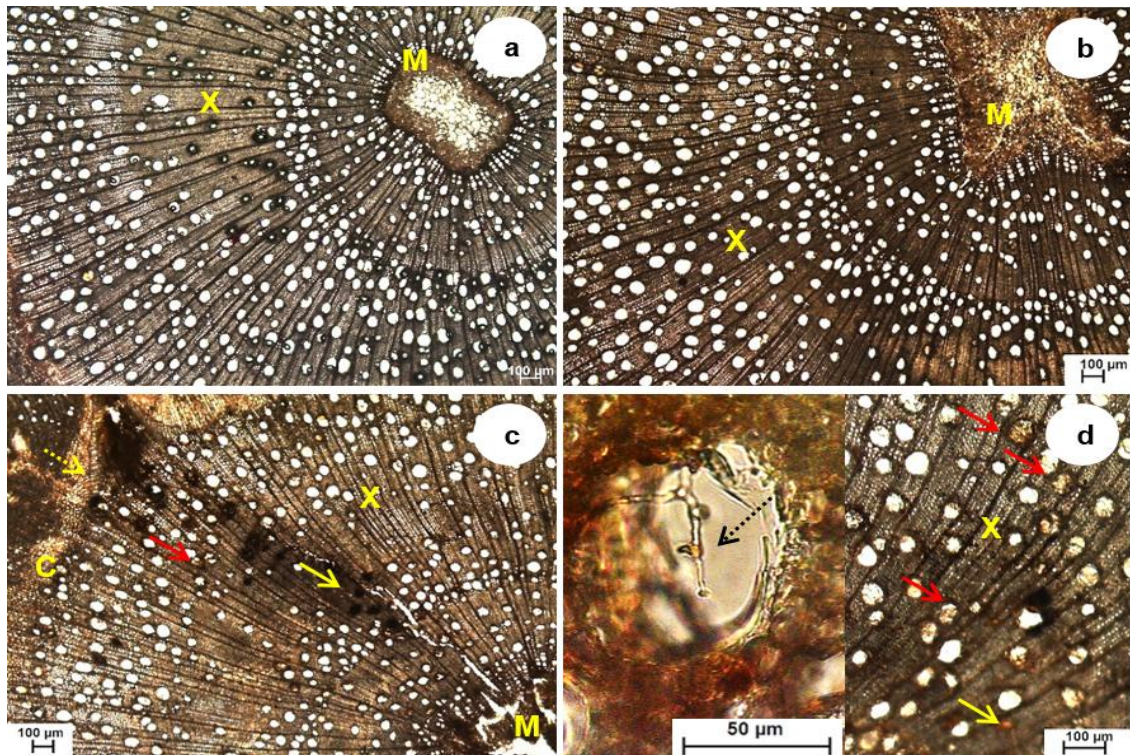


Figura 2. Secções transversais de caule de clone de eucalipto: 2a–2d, Clone BA6021: 2a-Tempo inicial (antes da inoculação com *Ceratocystis fimbriata* no caule) a 10 cm acima do colo da planta. X: Xilema, M: Medula (Controle); 2b–2d Tempo após 50 dias de inoculação com *C. fimbriata* a 3cm abaixo da lesão, 2b: X: Xilema, (Controle), M :Medula; 2c – C: Câmbio, X: Xilema, M :Medula. Seta vermelha indicando vaso do xilema infectado com *C. fimbriata*. Seta amarela indicando tecido necrosado. Seta amarela pontilhada região do câmbio formando novos tecidos; 2d – Seta vermelha indicando vaso do xilema com micélio de *C. fimbriata*. Seta preta pontilhada mostrando hifa de *Ceratocystis* com aumento de 50X. Seta vermelha indicando colonização no vaso do xilema e seta amarela indicando acúmulo de goma no xilema;

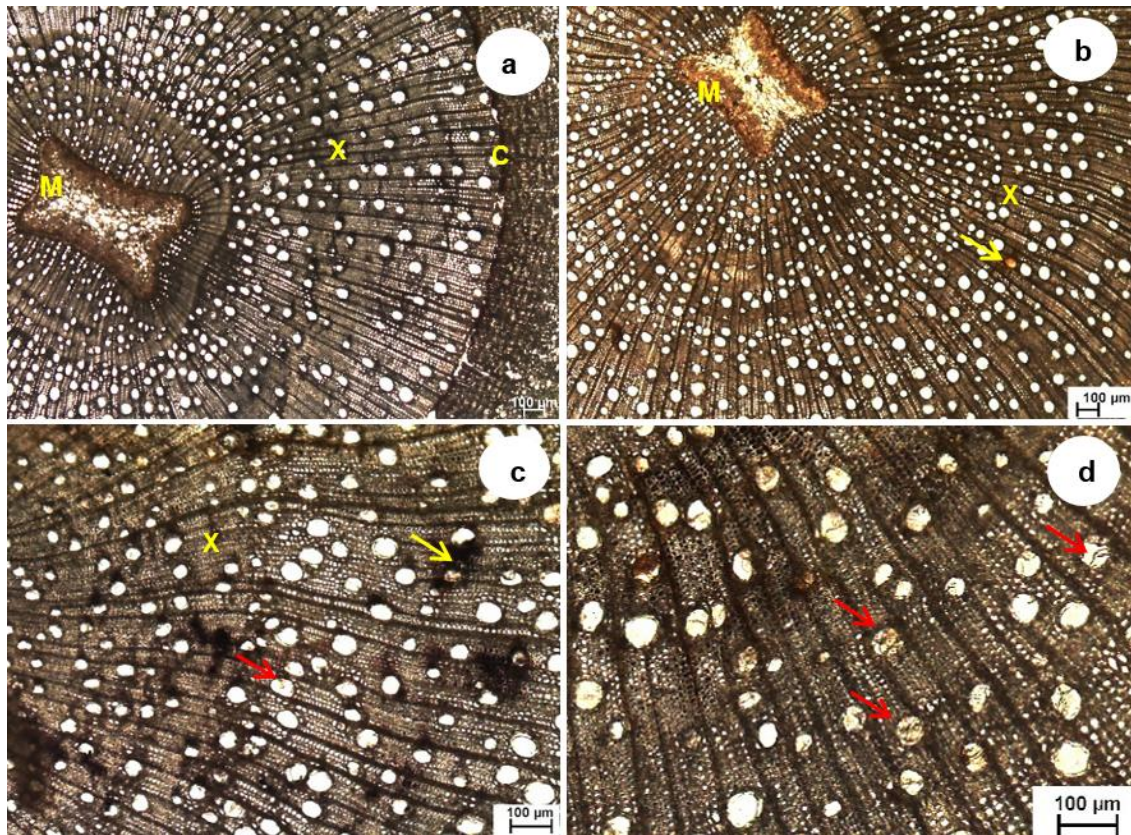


Figura 3. Secções transversais de caule de clone de eucalipto: 3a- 3d, Clone CO 1407: 3a - Tempo inicial (antes da inoculação com *C. fimbriata* no caule) a 10 cm acima do colo da planta. C: Câmbio, X: Xilema, M: Medula; 3b. Tempo após 50 dias de inoculação com *C. fimbriata* a três cm abaixo da lesão. X: Xilema, M: Medula. Seta amarela indicando acúmulo de goma ou géis no xilema; 3c - X: Xilema. Seta vermelha indicando vaso do xilema com micélio de *C. fimbriata*. Seta amarela indicando tecido necrosado. 3d – Seta vermelha indicando vaso do xilema com micélio de *C. fimbriata*.

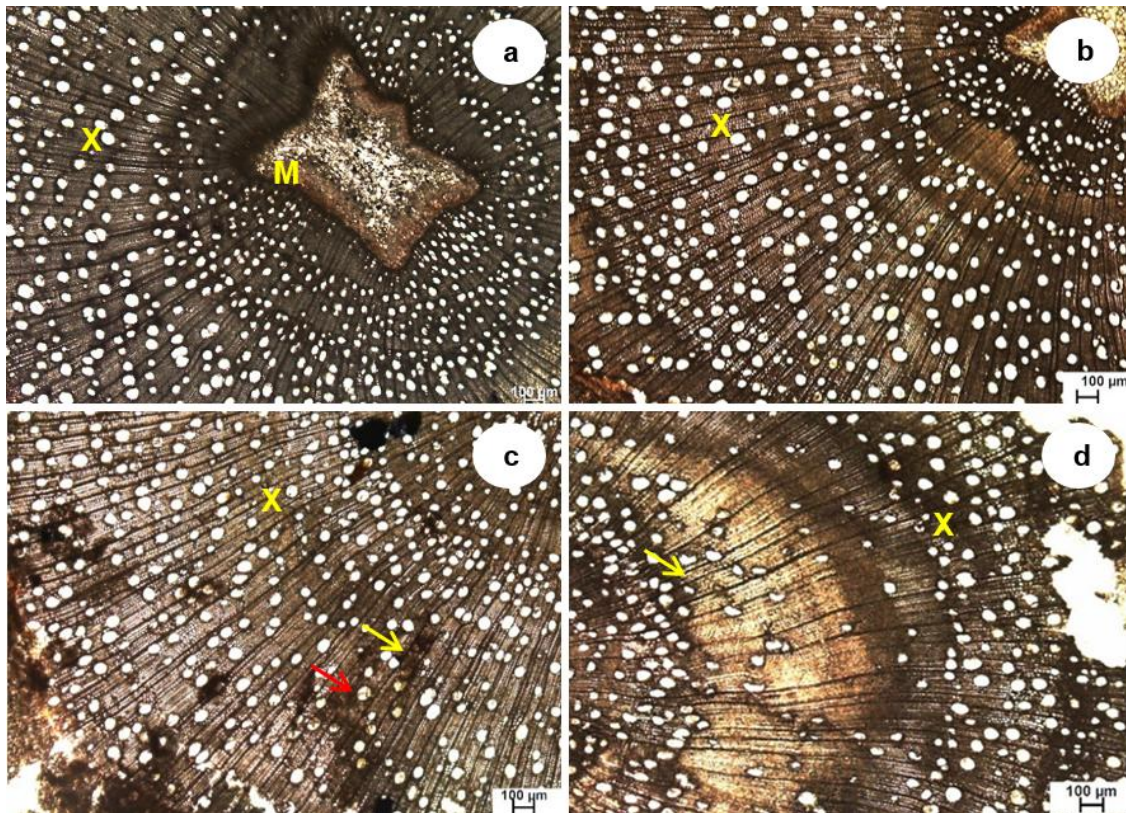


Figura 4. Secções transversais de caule de clone de eucalipto: 4a-4b, Clone AEC 1528. 4a-Tempo inicial (antes da inoculação com *Ceratocystis fimbriata* no caule) a 10 cm acima do colo da planta. X: Xilema, M: Medula (Controle); Tempo após 50 dias de inoculação com *C. fimbriata*. 4b-4d: Controle- Corte 2 a três cm acima da lesão - X: Xilema, M: Medula; 4c – Corte 1: três cm abaixo da lesão, X: Xilema. Seta vermelha indicando vaso do xilema infectado com *C. fimbriata*. Seta amarela indicando tecido necrosado; 4d – Corte 3: a 3cm acima da lesão. Seta amarela indicando tecido de cicatrização.

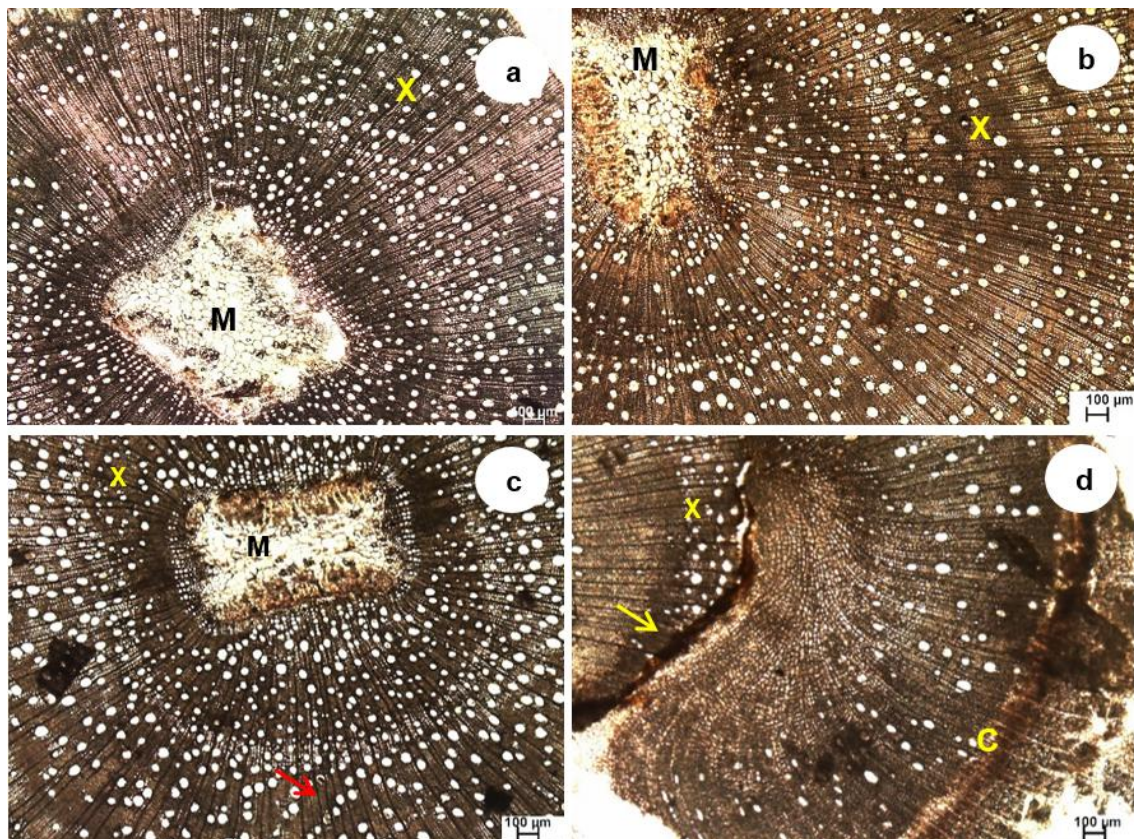


Figura 5. Secções transversais de caule de clone de eucalipto: 5a-5d, Clone BA 7346: 6a - Tempo inicial (antes da inoculação com *C. fimbriata* no caule a 10 cm acima do colo da planta, X: Xilema, M: Medula. Seta vermelha indicando vaso do xilema infectado com *C. fimbriata*; 5b-5d Tempo após 50 dias de inoculação com *C. fimbriata*, Corte 1; a três cm abaixo da lesão. X: Xilema; 5c – a três cm abaixo da lesão. X: Xilema, M: Medula; 5d: Corte 3: 3cm acima da lesão– X: Xilema, C: Câmbio. Seta branca indicando formação de novos tecidos de xilemático. Seta amarela indicando tecido de cicatrização.

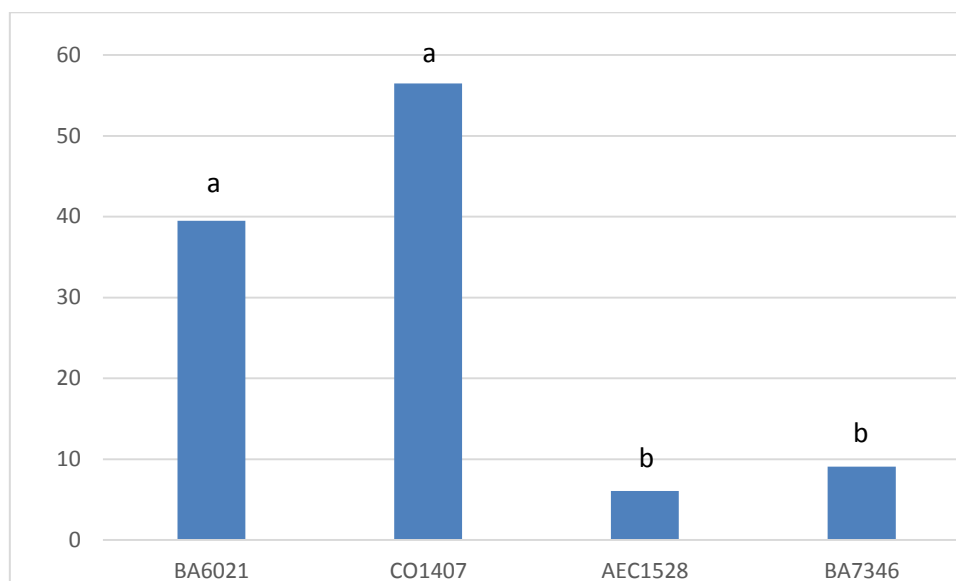


Figura 6. Porcentagem de vasos do xilema infectados de quatro clones de Eucalipto, 50 dias após a inoculação com *Ceratocystis fimbriata*. Médias seguidas por mesmas letras não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

Análises morfofisiológica

Os estudos morfofisiológicos relacionados à patogênese são importantes no entendimento dos mecanismos de resistência em diversos patossistemas, estando a estrutura celular e tecido da planta muito relacionada ao desenvolvimento das doenças vegetais (SILVA et al., 2005). Também, a resistência genética é uma das alternativas mais eficientes dentre as estratégias de controle de doença do eucalipto, em função principalmente das características da cultura (ALFENAS et al., 2009; ZAUZA et al., 2004). Desta forma, é imprescindível uma metodologia segura de análise, uma vez que o plantio de genótipos suscetíveis pode levar a perdas significativas de produção (MAFIA et al 2011, ALFENAS et al., 2009).

Estudos prévios, conduzido por Pascholati e Leite (1995) verificaram que de forma geral, as plantas desenvolveram mecanismos de defesa contra patógenos, os quais são desencadeados imediatamente após a presença destes organismos nos tecidos hospedeiros. Nesta interação, o simples contato entre o patógeno e o hospedeiro desencadeia uma série de reações de reconhecimento celular, resultando em

modificações estruturais, entre elas, mudanças morfológicas visíveis. Como visto nas diferenças entre incremento de crescimento de plantas inoculadas e não inoculadas relativas a altura e diâmetro (Figura 1).

Em diversos trabalhos os clones apresentaram-se assintomáticos, como o CO 1407, 50 dias após inoculação, entretanto com grande quantidade de vasos com desenvolvimento do micélio foram verificados. O não desenvolvimento do sintoma de murcha e, ou, morte das mudas inoculadas com o isolado de *C. fimbriata* é um resultado comum, embora, não esperado (FIRMINO et al., 2013; MARQUES, 2013; TUMURA, 2011; MAFIA et al., 2011; ZAUZA et al., 2004). Em campo a influência de fatores climáticos na expressão dessa doença pode camuflar os sintomas de infecção em épocas que exigem menor transpiração da planta, ou seja, épocas com temperaturas amenas e períodos de chuva bem distribuídos (FALAVESSA, 2014; FIRMINO et al., 2013; ZAUZA et al., 2004).

Os mecanismos da resistência à murcha de *Ceratocystis* são pouco elucidados. Trabalhos baseados em análises fenotípicas sugerem uma grande variabilidade genética para a resistência ao fungo em genótipos de eucalipto (ROSADO, 2009), como também evidenciado neste trabalho pelas diferentes respostas dos clones. Em adição, é relatado grande diversidade genética entre isolados de *C. fimbriata*, o que resulta em diferentes graus de agressividade do fungo para com os genótipos (ZAUZA et al., 2004). Tais fatores revelam complexidade da resistência a este patógeno. Os clones BA 6021, CO 1407, AEC 1528 e BA 7346 apresentaram plantas altamente suscetíveis a plantas altamente resistente, mostrando a variabilidades desses clones e grau de agressividade do fungo. Segundo Mafia et al. (2011), o uso do critério único de tamanho de lesão não apresenta boa correlação com a suscetibilidade.

Os padrões de crescimento em altura e em diâmetro ocorridos neste estudo, provavelmente estejam relacionados ao crescimento e desenvolvimento das plantas ao longo do tempo de avaliação. E as diferenças encontradas entre os valores médios de crescimento médio acumulado do caule e diâmetro dos clones resistente e suscetível foram determinadas pelas características genéticas e adaptativas de cada genótipo. O clone AEC 1528 apresentou crescimento similar em plantas inoculadas e não inoculadas, aparentemente, não apresentando significativa influência da infecção do fungo pelo isolado de *C. fimbriata*. Os clones CO 1407 e BA 7346 consideradas resistentes na metodologia de comprimento do xilema apresentaram crescimento médio acumulado do caule e diâmetro maior em plantas inoculadas. Marques (2013) também

observou plantas de *Eucalyptus grandis* inoculadas com isolado de *C. fimbriata* com taxa de crescimento e diâmetros maiores quando comparadas a plantas não inoculadas.

Como não houve comprometimento do crescimento das plantas ao longo do período de avaliação e uma vez que, na maioria dos clones não foram observadas redução no crescimento médio acumulado do caule, pode-se inferir que o tempo de avaliação não foi suficiente para que a infecção causada pelo *C. fimbriata* promovesse danos consideráveis ao sistema vascular consequentemente, interferindo efetivamente no crescimento da planta.

Na literatura menores índices de crescimento em altura são associados a uma maior expressão da doença, culminando em sintomas de murcha e/ou morte, sendo o crescimento de mudas de eucalipto em altura e biomassa da parte aérea, utilizados como variáveis para auxiliar na avaliação da murcha de *Ceratocystis* (MAFIA et al., 2011). O clone BA 6021 apresentou este padrão de avaliação, apresentando a redução crescimento médio acumulado do caule, do diâmetro e murcha em planta como descrito na literatura.

No presente estudo, os clones BA 6021, CO 1407 e BA 7346, não apresentaram diferenças nos parâmetros de fotossíntese líquida (A) (condutância estomática (g_s), transpiração (E) e concentração de CO_2 interna e concentração de CO_2 atmosférica (C_i/C_a)), provavelmente por terem sido irrigadas diariamente. Como foi observado por Ferreira et al. (2006), o surgimento da murcha causada por *C. fimbriata* na região sudeste da Bahia e em plantações monoclonais nos estados de Mato Grosso e Minas Gerais estavam associadas ao déficit hídrico anormal naquelas regiões. O fungo se prolifera em condições de déficit hídrico nos vasos do xilema e a morte ocorre quando o desenvolvimento do fungo se estabelece no câmbio vascular (FERREIRA et al., 2006). Pshibytko et al. (2006) observaram em plantas de tomateiro, que os esporos de *Fusarium oxysporium* desse fungo ao atingir o xilema desenvolveram rapidamente atingindo o floema. Consequentemente o fluxo no xilema e floema foi obstruído, causando déficit hídrico e escassez de nutrientes na planta, causando murcha nas plantas estudadas.

Os valores médios apresentados pelas plantas inoculadas do clone AEC 1528, nos parâmetros de fotossíntese líquida, condutância estomática e transpiração foram menores em relação ao controle. O clone AEC 1528 foi considerado resistente neste estudo com crescimento de micélio do fungo restrito ao local de infecção. O esperado era que esses valores médios fossem superiores ou igual aos valores médios das plantas

controle. Isso pode ser explicado, pela clorose apresentada nas plantas, 50 dias após a infecção do fungo. Segundo Taiz e Zeiger (2013) o sintoma de clorose é causado pela deficiência de nitrogênio na planta e segundo esses autores esse elemento mineral está envolvido no processo fotossintético e apresenta papel principal na constituição da clorofila. Portanto pode-se inferir que os valores médios das plantas inoculadas não sofreu interferência pela infecção do fungo.

Nos parâmetros de fotossíntese líquida (A) (condutância estomática (g_s), transpiração (E) e concentração de CO_2 interna e concentração de CO_2 atmosférica (C_i/C_a)), a infecção do fungo não interferiu no desenvolvimento dos clones. Falavessa, (2014) estudando aumento da concentração de CO_2 em cenários atuais x cenários futuros em clones de eucalipto inoculados com *Ceratocystis*, relatou que quanto a fotossíntese líquida no cenário atual ($T24^\circ C$, CO_2 400 micro mol) não houve diferenças de valores médios, já no parâmetro de condutância estomática e transpiração o clone resistente inoculado apresentou valores inferiores nesses parâmetros.

Análises anatômicas

O estudo da anatomia da infecção do fungo nos vasos do xilema é importante para identificar estruturas anatômicas diferenciais nos genótipos, objetivando compreender os mecanismos envolvidos nas respostas de defesa da planta ao fungo. Em estudos visando à resistência de *C. fimbriata* com cortes histológicos alguns autores observaram, suspeita de lignificação do micélio em vaso colonizado pelo fungo, além da presença de estruturas que confere resistência à colonização nos tecidos como: tiloses, gomas ou géis (FIRMINO et al., 2015; VIEIRA, 2015; TUMURA, 2011; SUN et al, 2008).

Além de tiloses, gomas ou géis há relatos que genótipos resistentes e suscetíveis têm por característica apresentar distinção nas estruturas anatômicas. Características anatômicas indicativas de qualidade e resistência podem ser disposição e forma das células; quantidade de fibras; espessura da parede celular; número de elementos de vaso e lignificação. Além disto, estas características são consideradas muitas vezes características intrínsecas de determinados genótipos (SILVA et al., 2005).

A planta, como estratégia de sobrevivência, quando tem porções de seu tecido necrosado pela infecção do fungo, produz novos tecidos xilemáticos e tecido de cicatrização, como observado nos clones resistentes AEC 1528 e clone BA 7346 (Figura 4d e 5d). As plantas para impedir a invasão de micro-organismos desenvolvem

mecanismos de resistência, formando barreiras físicas à penetração e/ou colonização do patógeno, obstruindo os vasos com gomas ou géis (Figura 2d e 3b). As gomas ou géis são formados pelas plantas 48 horas após o ataque do fungo em ambas as cultivares, resistentes e suscetíveis, mas subsequentemente são degradados pelas enzimas do fungo, principalmente nas cultivares suscetíveis (SUN et al., 2008). Segundo Mafia et al. (2013) a ocupação dos vasos pelas estruturas do fungo bem como a formação de gomas ou géis pode limitar a penetração do líquido de cozimento, apresentando, consequentemente, menor rendimento de polpa de celulose e maior consumo de madeira.

Todos os cortes transversais dos clones estudados apresentaram lignina pelo crescimento natural da planta (Figura 2, 3, 4 e 5). A lignina depositada sobre as células é uma das barreiras impostas aos patógenos impedindo sua colonização, uma vez que aumenta-se a resistência das paredes celulares à ação de enzimas de degradação oriundas dos patógenos, evitando também a difusão de toxinas e a passagem de nutrientes da planta para o parasita (AGRIOS, 2005; SILVA et al., 2005). O clone CO 1407 considerado suscetível a *C. fimbriata* pela metodologia do comprimento do xilema neste estudo, na maioria das plantas, apresentou também uma pequena porção de plantas resistentes (Figura 1). Vieira, 2015 observou deposição de tilose nos vasos do xilema da raiz do clone CO 1407, indicando que este clone apresenta um sistema de defesa envolvido na resistência a estresses hídricos, seja ele ocasionado por patógenos ou não. A evidência desta estrutura é uma peculiaridade do genótipo CO 1407, não observadas nos demais clones, estudado por este autor. *C. fimbriata* é um patógeno típico do xilema, durante o processo de infecção o patógeno ocupa estes vasos e causa a morte da planta devido o impedimento de transporte de substâncias e metabólitos necessários a sobrevivência. Como forma de defesa a essa ocupação foi identificado em genótipos resistentes a formação de tiloses nos vasos do xilema, impedindo a colonização dos vasos (FIRMINO et al., 2015, TUMURA et al., 2012).

CONCLUSÃO

As plantas de eucalipto apresentaram mecanismos de resistência: gomas ou géis, tecidos novos próximos à região de infecção do *Ceratocystis fimbriata*.

Os clones BA 6021, CO 1407, AEC 1528 e BA 7346 apresentaram diversidade de respostas com plantas altamente suscetíveis a planta altamente resistente, mostrando variação as plantas desses clones quanto a agressividade do fungo.

Os clones AEC 1528 e BA 7346 mostraram-se resistente ao fungo *C. fimbriata* e o clone BA 6021 apresentou a maioria de suas plantas suscetíveis.

AGRADECIMENTOS:

À UFES e Professora Dra Maria A. Ferreira, da UFLA, por ceder o isolado de *Ceratocystis fimbriata*.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- AGRIOS, G. N. 2005: Plant pathology. San Diego: Elsevier Academic Press, (5nd. ed.). 922p.
- Alfenas, A. C.; Zauza, E. A. V.; Mafia, R. G.; Assis, T. F. 2009: Clonagem e doenças do eucalipto. (2nd ed.). Editora UFV. Viçosa, Brasil.
- Falavessa, M. 2014: Impacto das mudanças climáticas na resistência de clones de eucalipto a *Ceratocystis fimbriata*. 61 p. Dissertação (Mestre em Ciências Florestais)- Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória. 2014.
- Ferreira, F. A.; Maffia, L. A.; Barreto, R. W.; Demuner, N. L.; Pigatto, S. 2006: Sintomatologia da murcha de *Ceratocystis fimbriata* em eucalipto. Revista Árvore, 30, 155-162.
- Firmino, A. C.; Tanaka, F. A. O.; Silva, S. D. V. M.; Ito, M.F.; Furtado, E. L. 2015: Colonização do xilema de eucalipto por *Ceratocystis* spp isolado de diferentes hospedeiros. Summa Phytopathologica. Botucatu, 41, 138 - 146.
- Firmino, A. C.; Junior, H. J. T.; Souza, I. C. G. D. E.; Furtado, E. L. 2013: Resistência de genótipos de Eucalipto a *Ceratocystis* sp. Scientia Forestalis, 41, 165-173.
- Firmino, A. C.; Júnior, H. J. T.; Costa, P. N.; Furtado, E. L. 2012: *Ceratocystis fimbriata* causando seca em atemóia na região de Botucatu-SP. Summa Phytopathologica, Botucatu. 38, 171-171.
- Firmino, A. C. Caracterização de isolados de *Ceratocystis* sp., avaliação de resistência clonal de eucalipto e sensibilidade deste fungo a diferentes fungicidas. 2011. Tese (Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista. Botucatu. 2011.
- Indústria Brasileira de Árvores (IBÁ). 2016: Desempenho das árvores plantadas. 4. 96.
- Mafia, R. G.; Ferreira M. A.; Zauza E. A. V.; Silva J. F.; Colodette J. L.; Alfenas A. C. 2013: Impact of *Ceratocystis* wilt on eucalyptus tree growth and cellulose pulp yield. Forest Pathology, 1-7.
- Mafia, R. G.; Alfenas A. C.; Ferreira, E. A.; Binot, D. H. B. 2011: Método de seleção e identificação de fontes de resistência à murcha do eucalipto causada por

- Ceratocystis fimbriata*. Revista Árvore: Viçosa, v.35, n.4, p.817-824.
- Marques, A. Identificação de genes diferencialmente expressos em híbridos de *Eucalyptus* inoculados com isolados de *Ceratocystis fimbriata*. 2013. Dissertação (Mestre em Ciência Florestal)- Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. Diamantina, 2013.
- Myburg, A. A.; Grattapaglia, D.; Tuskan, U. H.; Hellsten, U. Hayes, J. G.; Jenkins, J. 2014: The genome of *Eucalyptus grandis*. Nature, 510, 556-562.
- Pascholati, S. F.; Leite, B. 1995: Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: Bergamin Filho, A.; Kimati, H.; Amorim, L. 1995: Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos. Ceres, São Paulo. (3 nd ed), 1, 417-452.
- Pshibytko, N. L.; Zenevich, L. A.; Kabashnikova, L. F. 2006: Changes in the Photosynthetic apparatus during *Fusarium* wilt of tomato. Russian Journal Plant Pathology, Moscou, 53, 25-31.
- Rosado, C. C. G; Guimarães, L. M. S.; Faria, D. A.; Resende, M. D. V.; Cruz, C. D.; Grattapaglia, D.; Alfenas, A. C. 2016: QTL mapping for resistance to *Ceratocystis* wilt in *Eucalyptus*. Tree Genetics & Genomes. 12, 62-72.
- Rosado, C. C. G; Guimarães, L. M. S.; Titon, M.; Alfenas, A. C. 2010: Resistance to *Ceratocystis* Wilt (*Ceratocystis fimbriata*) in Parents and Progenies of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. Silvae Genetica, 59, 99–106.
- Rosado, C. C. G. Genética da resistência à murcha-de-*Ceratocystis* (*Ceratocystis fimbriata*) em *Eucalyptus*. spp. 2009. Dissertação (Mestre em Ciências Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa. Viçosa.
- Santos, A.F. 2004. Murcha de *Ceratocystis* em Acácia-negra. Comunicado Técnico125. Colombo, Paraná. 3.
- Sistema Nacional De Floresta Plantada (SNIF). 2016: As Florestas plantadas. < <http://www.florestal.gov.br/snif/recursos-florestais/as-florestas-plantadas> >
- Silva, L. M. et al. Inter-relações entre a anatomia vegetal e a produção vegetal. 2005: Acta botânica brasileira. 19, 183-194.

- Sun, Q.; Rost, T. L.; Mathews, M. A. 2008: Wound-induced vascular occlusions in *Vitis vinifera* (*Vitaceae*): tyloses in summer and gels in winter. *American Journal of Botany*. 95, 1498–1505.
- Taiz, L.; Zeiger, E. 2013: *Fisiologia vegetal*. (5nd. ed.) Artmed, Porto Alegre. 954.
- Tumura, K.G. Avaliação de resistência, análise epidemiológica e caracterização anatômica da madeira em clones de *Eucalyptus* sp infectado por *Ceratocystis fimbriata*. 2011. Dissertação (Mestre em Ciências Florestais) – Faculdade de Ciências Agronômicas UNESP. Botucatu. 2011.
- Tumura, K. G.; Piere, C. D.; Furtado, E. L. 2012: Murcha por *Ceratocystis* em eucalipto: avaliação de resistência e análise epidemiológica. *Summa Phytopathologica*, 38, 54-60.
- Viera, P. M. Identificação de marcadores de genes de resistência a patógenos em eucalipto e soja por RGA. 2015. Dissertação (Mestre em Genética e Melhoramento) Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória. 2015.
- Zauza, E. A. V.; Alfenas, A. C.; Harrington, T. C.; Mizubuti, E. S.; Silva, J. F. 2004: Resistance of *Eucalyptus* clones to *Ceratocystis fimbriata*. *Plant Disease*, Saint Paul, 88, 758-760.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A proposta desse ensaio, estudar o desenvolvimento de uma metodologia de avaliação fenotípica precoce e não destrutiva com discos foliares em clones comerciais de híbridos interespecíficos de *Eucaliptus urograndis* quanto a infecção ao *Ceratocystis fimbriata* e avaliar alterações morfofisiológicas nestes clones decorrentes desse patógeno.

Verificou-se na análise morfofisiológica e anatômica que as plantas apresentaram mecanismo de resistência: gomas ou géis, tecidos novos próximo a região de infecção de *Ceratocystis fimbriata*. Os clones BA 6021, CO 1407, AEC 1528 e BA 7346 apresentaram grande diversidade de respostas com plantas altamente suscetíveis a planta altamente resistente, mostrando a grande variabilidade desses clones e grau de agressividade do fungo. Os clones AEC 1528 e BA 7346 mostraram-se resistente ao fungo *C. fimbriata* e o clone BA 6021 a maioria de suas plantas suscetíveis.

Foi encontrado material altamente resistentes à doença, que poderá ser usado como fonte de resistência em programas de melhoramento genético.